

Université de Sherbrooke

**Implication de l'apeline dans le maintien de l'équilibre hydrique au niveau
rénal**

Par

Chahrazed Boulkeroua (épouse Boudjadi)

Programme de physiologie

Mémoire présenté à la faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de
l'obtention du grade de maître en sciences (M. Sc.) en physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada

Novembre 2015

Membres du jury d'évaluation

Pr Ahmed Chraïbi, PhD. Programme de physiologie

Pr Pedro Geraldès, PhD. Programme de physiologie

Pr Mannix Auger-Messier, PhD. Département de Médecine, Service de cardiologie

© Chahrazed Boulkeroua, 2016

RÉSUMÉ

La régulation de la balance hydrosodée est l'une des principales fonctions du rein. L'équilibre hydro-sodique de l'organisme est contrôlé de façon complémentaire par le système rénine-angiotensine-aldostérone et la vasopressine, une hormone antidiurétique appelée arginine-vasopressine (AVP). L'action rénale de cette hormone dépend essentiellement de la présence des aquaporines. Au niveau des cellules principales du néphron distal, trois isoformes des aquaporines (AQP2, AQP3 et AQP4) sont impliquées dans la réabsorption de l'eau sous le contrôle de l'AVP. Ainsi, la vasopressine joue un rôle primordial dans la régulation fine et la détermination de la concentration finale des urines. En plus de son effet antidiurétique au niveau rénal, la vasopressine contrôle l'équilibre hydrique au niveau central via son récepteur V1 exprimé au niveau de l'anté-hypophyse. Des études récentes ont montré que l'apeline et son récepteur APJ sont fortement exprimés au niveau de ces mêmes neurones et suggèrent que le système apelinergique exerce un effet anti-vasopressinergique au niveau central.

Par ce travail je m'intéresse à vérifier si l'apeline, en plus de son effet central, aurait une action opposée à celle exercée par la vasopressine au niveau rénal. J'ai tout d'abord montré que le récepteur APJ est bien exprimé dans les cellules mpkCCD_{c14} (cellules issues du tubule collecteur, un modèle de choix pour étudier l'équilibre hydrique au niveau rénal). Par la suite, j'ai montré que l'apeline a un effet opposé à celui de l'AVP sur l'expression, à court et à long terme, de l'AQP2 en réduisant ses niveaux d'ARNm et de protéine dans ces cellules. Finalement, mes résultats indiquent que cette réduction est associée à une diminution importante de la densité de la forme phosphorylée de l'AQP2 (AQP2-S269) au niveau de la membrane apicale des cellules mpkCCD_{c14}. L'ensemble de mes résultats suggèrent donc que l'apeline, par son action sur l'AQP2, entraîne une baisse de la réabsorption de l'eau par les cellules du tube collecteur rénal. Ainsi, notre constatation donne une nouvelle compréhension de l'implication de l'apeline dans la régulation de l'homéostasie de l'eau.

SUMMARY

Apelin was recently discovered as the endogenous ligand of the APJ receptor, a receptor with 7 seven-transmembrane domains belonging to the family of GPCRs (G-protein-coupled receptors). Apelin and its receptor are strongly expressed in the vasopressinergic magnocellular neurons suggesting that the apelin/APJ system play a key role in regulating salt and water balance at central level. APJ was reported to be expressed in the glomerular arterioles and along the collecting duct of the nephron. Related to this finding, it was reported that apelin induces vasodilatation of glomerular arterioles by antagonizing angiotensin II. A recent study showed that the apelin counteracts vasopressin-induced water reabsorption via a direct action in rat collecting duct but the mechanisms of this peripheral effect are not clearly understood. In this study, we investigate the effects of apelin on the aquaporin-2 expression in mpkCCD_{c14} cells. Our results indicate that the apelin antagonize the AVP effect by reducing mRNA and protein expression of AQP2 in mpkCCD_{c14} cells. Furthermore, we found that this effect is associated with a large decrease of AQP2-pS269 density at apical membrane. Our finding corroborates that the apelin, in addition to its central effect, antagonizes the action of AVP on the renal collecting duct cells.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
SUMMARY	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
INTRODUCTION	1
1.Rein et équilibre hydrique	1
1.1. Rappel anatomique et histologique.....	1
1.2. Physiologie rénale.....	4
1.2.1. La filtration glomérulaire	4
1.2.1.1. Le mécanisme intrinsèque.....	5
1.2.1.2. Le mécanisme extrinsèque	5
1.2.2.La réabsorption tubulaire	5
1.2.3.Sécrétion tubulaire	8
1.2.4.Concentration des urines.....	8
1.2.4.1. Le système d'échange à contre-courant	8
1.2.4.2. Action de l'AVP et perméabilité du tube collecteur à l'eau	9
1.2.5.Fonctions endocrines du rein.....	9
2.La vasopressine	10
2.1. Gène, synthèse et lieu de stockage	11
2-2 Récepteurs et fonctions de l'AVP	12
2.3. Action à court terme de l'AVP (non génomique) sur la réabsorption de l'eau	15
2.4. Action à long terme (génomique) de l'AVP sur la réabsorption de l'eau	15
3. Les aquaporines	17
3.1. Différents types d'aquaporines	17
3.2. Gène de l'AQP2.....	21
3.3. Particularités structurales et localisation de l'AQP2	23
3.4. Régulation de l'expression et de la localisation subcellulaire de l'AQP2	23
4.L'apeline	31
4.1. Historique et découverte de l'apeline	31
4.2. Structure, expression et caractéristiques fonctionnelles	32
4.2.1. Expression de l'apeline et son récepteur dans le cerveau.....	36
4.2.2. Expression de l'apeline et son récepteur dans le rein	36
4.3. Signalisation induite par le récepteur APJ	38
4.4. Fonctions connues de l'apeline	39
4.4.1. Effet sur le système cardiovasculaire	39
4.4.2. Effet sur la régulation de l'équilibre hydrique	42

4.4.2.1. Action centrale	42
4.4.2.2. Action périphérique	42
PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	44
MATÉRIELS ET MÉTHODES	45
1. Culture cellulaire	45
2. Extraction protéique et immunobuvardage	45
3. Déglycosylation des protéines	47
4. Extraction d'ARN et quantification	47
5. Fractionnement subcellulaire	47
6. Microscopie confocale à fluorescence	48
7. Analyses statistiques.....	49
RÉSULTATS	50
1. Validation du modèle expérimental	50
1.1. Mise en évidence de l'expression endogène de l'APJ dans les cellules du tubule collecteur de néphron de souris, les mpkCCD _{c14}	50
1.2. Choix des filtres pour étudier l'expression de l'AQP2 dans les mpkCCD _{c14}	52
2. Effet de l'apeline sur l'expression de l'ARNm de l'AQP2	54
3. Effet de l'apeline sur l'expression protéique totale de l'AQP2.....	56
4. Glycosylation de l'AQP2 et effet de l'apeline	56
5. Effet de l'apeline sur la densité membranaire de l'AQP2	59
DISCUSSION	66
1. L'apeline antagonise l'effet de l'AVP et diminue l'expression de l'AQP2 à court et à long terme, dans les cellules principales du tube collecteur rénal.	66
2. L'apeline réduit la quantité d'AQP2 présente à la membrane apicale des cellules mpkCCD _{c14} , même en présence de l'AVP.	69
CONCLUSION	72
REMERCIEMENTS.....	73
LISTE DES RÉFÉRENCES	74

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Structure du néphron.....	2
Figure 2.	Le canal collecteur du rein	4
Figure 3.	Schéma récapitulatif des mouvements de l'eau et du NaCl le long du néphron	7
Figure 4.	Équilibre hydrique et vasopressine	10
Figure 5.	Processus de la synthèse de l'AVP	13
Figure 6.	Représentation schématique de la structure du récepteur V ₂ R de l'AVP	14
Figure 7.	Régulation transcriptionnelle de l'AQP2 suite à l'action de l'AVP	16
Figure 8.	Représentation schématique de la structure et l'organisation des aquaporines....	18
Figure 9.	Expression différentielle des aquaporines dans le tube rénal	22
Figure 10.	Structure schématique de l'aquaporine 2 montrant les différentes mutations à l'origine du diabète insipide néphrogénique	24
Figure 11.	Représentation schématique des principaux sites de phosphorylation de l'AQP2	28
Figure 12.	Régulation de l'AQP2 par phosphorylation induite par l'AVP	29
Figure 13.	Mécanisme de la translocation de l'AQP2 du cytoplasme vers la membrane apicale de la cellule	30
Figure 14.	Séquence de la proapeline et les homologues de séquences entre l'homme, le bœuf, la souris et le rat	33
Figure 15.	Représentation schématique de la composition de l'apeline et ses différentes formes	34
Figure 16.	Expression de l'apeline comparée à celle de l'AVP dans l'hypothalamus ainsi que son action centrale	37
Figure 17.	Expression de l'ARNm de l'APJ le long du néphron	38
Figure 18.	Voies de signalisation pouvant être moduler par le récepteur APJ	40
Figure 19.	Action de l'apeline au niveau des cellules des vaisseaux sanguins	41
Figure 20.	Expression du récepteur APJ dans les cellules mpkCCD _{c14}	51
Figure 21.	Comparaison entre l'expression de l'AQP2 par les cellules mpkCCD _{c14} en culture sur les filtres de polycarbonate et de polyester	53
Figure 22.	Effet de l'apeline ₁₃ sur l'expression de l'ARNm de l'AQP2	55
Figure 23.	Effet de l'apeline ₁₃ sur les niveaux protéiques de l'AQP2	57
Figure 24.	L'apeline diminue l'expression de l'AQP2 dans les fractions membranaires des cellules mpkCCD _{c14}	61
Figure 25.	Immunolocalisation de l'AQP2 dans les cellules mpkCCD _{c14} en réponse au traitement par la dDAVP et l'apeline	62
Figure 26.	Images d'immunofluorescence représentatives de l'effet de l'apeline sur la localisation de la forme phosphorylée de l'AQP2 (AQP2-pS269) dans les cellules mpkCCD _{c14}	64
Figure 27.	Schéma hypothétique montrant les différentes actions anti-vasopressinergiques possibles de l'apeline dans la cellule principale du canal collecteur du rein.	71

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Distribution de l'apeline et son récepteur APJ dans différents tissus et organes chez l'homme, la souris et le rat	35
Tableau 2. Différences entre les filtres en polycarbonate et les filtres en polyester	52

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA :	acide aminé
ACTH :	<i>adrenocorticotropic hormone</i>
AKT :	ou PKB protéine Kinase B
AMPC :	adénosine monophosphate cyclique
APJ:	<i>Putative receptor protein related to AT₁</i>
AQP :	aquaporine
AQP2 :	aquaporine 2
ARNm :	acide ribonucléique messenger
AVP:	arginine-vasopressine
CCD:	<i>cortical collecting duct</i>
CHIP28:	<i>channel-like integral protein of 28 kDa</i>
CREB:	<i>C-AMP Response Element-binding protein</i>
CRH:	<i>Corticotropin-releasing hormone</i>
DAPI:	diamidino-2-phénylindol dihydrochloride
dDAVP:	1-desamino-8-d-arginine vasopressine
DTT:	dithiothréitol
ECL:	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA:	<i>Ethylenediaminetetra-acetic acid</i>
Epac:	<i>exchange protein directly activated by cAMP</i>
ERK:	<i>extracellular signal-regulated Kinase</i>
FBS:	<i>Fetal bovine serum</i>
GAPDH:	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
HUVEC:	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IP3:	inositol triphosphate
JNK:	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
MEK:	<i>Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase</i>
MLCK:	<i>Myosin light-chain kinase</i>
mpkCCDc14:	<i>mouse immortalized cortical collecting duct principal (clone 14)</i>
mTOR:	<i>mammalian target of rapamycin</i>
Munc18:	<i>Mammalian uncoordinated-18.</i>
NFKB:	<i>nuclear factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NSF:	<i>N-ethylmaleimide sensitive factor</i>
OCLN:	<i>Occludin</i>
OTR:	<i>Oxytocin receptor</i>
PBS:	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PI3K:	<i>phosphoinositide 3-Kinase</i>
PKA:	protéine kinase A
PKB :	protéine Kinase B
PKC:	protéine kinase C
PLC:	phospholipase C
PNGaseF:	Peptide-N-Glycosidase F
PVDF :	Polyvinylidene difluoride

PVN :	<i>paraventricular nucleus</i>
RAS :	<i>Rat sarcoma small GTPase</i>
RCPG :	récepteur couplé aux protéines G
RER :	réticulum endoplasmique rugueux
SNARE :	vAmP-2, SNAP-23, syntaxin-3 et syntaxin-4
SON :	<i>supraoptic nucleus</i>
SRAA :	système rénine-angiotensine-aldostérone
TBST:	<i>Tris-buffered saline tween</i>
TC:	tube collecteur
TCD :	tube contourné distal
TCP :	tube contourné proximal
TM5b :	tropomyosine-5b
TP:	température pièce

INTRODUCTION

1. Rein et l'équilibre hydrique

Le rein est l'un des principaux organes intervenant dans la régulation de l'équilibre hydro-électrolytique de l'organisme, en assurant une sélectivité remarquable de l'excrétion et la réabsorption de l'eau et des solutés. Le rein est aussi un organe de détoxification, car il élimine des produits toxiques et les déchets métaboliques de l'organisme qui constituent le produit final qu'est l'urine. Cet organe produit des facteurs et hormones impliqués dans plusieurs processus physiologiques telles que la régulation de la pression artérielle par le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), la production des globules rouges par la sécrétion de l'érythropoïétine, ou encore la contribution dans la maturation de la vitamine D en utilisant le calcium absorbé au niveau de l'intestin grêle.

1.1. Rappel anatomique et histologique

Les reins sont deux organes sous forme d'haricot, anatomiquement ils prennent place dans le rétro-péritoine en position sous diaphragmatique, l'un à droite et l'autre à gauche. Ils sont situés entre la 12^{ème} vertèbre thoracique et 3^{ème} vertèbre lombaire (Jennette et Heptinstall, 2007). La surface externe du rein est recouverte d'une capsule lisse recouvrant une face latérale convexe et une face interne concave qui comporte une fente centrale appelée le hile rénal. À ce niveau se trouve le sinus où se regroupent l'uretère, la veine rénale, l'artère rénale, les vaisseaux lymphatiques et les nerfs. Sur une coupe longitudinale, on peut distinguer deux zones principales : le cortex et la médullaire. Cette dernière comporte les pyramides de Malpighi, séparées par les colonnes rénales. Les pyramides se terminent par des papilles qui plongent dans les calices qui forment le pelvis rénal puis l'uretère.

Histologiquement le rein comporte une unité structurale et fonctionnelle tubulaire appelée le néphron. Chaque rein peut comporter de 6 à 12 millions de néphrons (Mills, 2007). Chaque néphron est composé d'un corpuscule rénal et d'un système tubulaire (figure1).

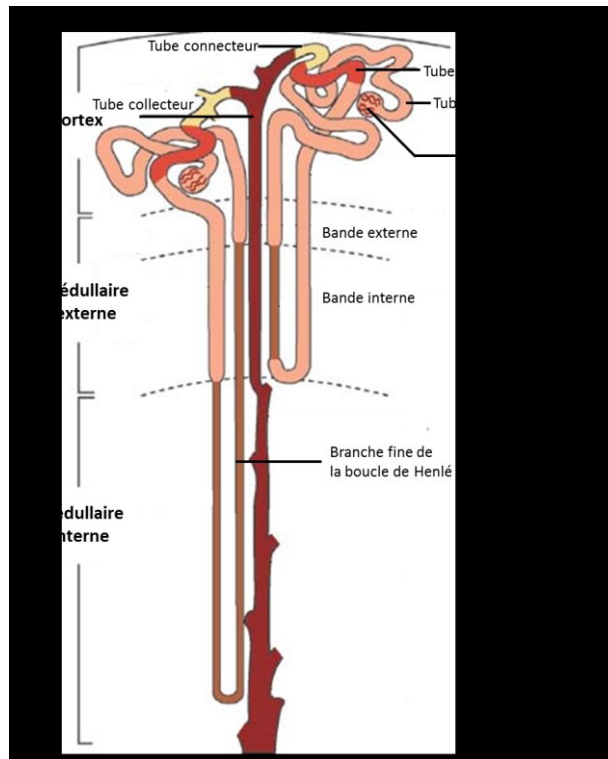


Figure 1. Structure du néphron. Représentation schématique de deux néphrons, juxta-médullaire (à gauche) et cortical (à droite) qui se déversent tous les deux dans un même tube collecteur au centre. Les néphrons corticaux représentent 85% des néphrons et s'arrêtent au niveau de la bande interne de la médulla externe, alors que les néphrons juxta-médullaires (15% des néphrons) ont une branche fine de Henlé plus longue et s'étendent jusqu'à la médulla interne. Modifié de (Madsen et Tisher, 1986)

Le corpuscule rénal comporte le glomérule, formé d'un réseau de capillaires et d'une capsule de Bowman. Les corpuscules sont localisés principalement dans la zone corticale du rein (figure 1) et sont le siège de la filtration glomérulaire. Les capillaires du glomérule sont tapissés d'un endothélium fenestré facilitant les échanges entre le plasma et la chambre glomérulaire. La capsule de Bowman est formée d'un feuillet pariétal externe structurel et d'un feuillet viscéral tapissé de podocytes faisant partie de la membrane de filtration glomérulaire. Entre les deux feuillets se trouve la chambre glomérulaire qui se prolonge par le tube rénal.

Le tube rénal s'étend le long de la corticale et la médullaire et subit plusieurs pelotonnements et allongements systématisés lui conférant plusieurs subdivisions fonctionnelles assurant une réabsorption sélective d'eau et d'électrolytes (Na^+ , Cl^- , K^+ , H^+ etc...) à partir du filtrat glomérulaire. À partir du glomérule, le système tubulaire du néphron comporte successivement quatre parties : le tube contourné proximal (TCP), l'anse de Henlé, le tube contourné distal (TCD) qui se termine dans le tube collecteur (TC) (figure 1). Ce dernier traverse la pyramide de Malpighi dans toute sa longueur et draine l'urine qui provient d'environ 11 glomérules.

Histologiquement le tube rénal est tapissé d'une monocouche de cellules épithéliales polarisées reposant sur une mince couche basale. La structure et la fonction des monocouches épithéliales diffèrent d'un segment tubulaire à l'autre. Au niveau du TCP, les cellules épithéliales sont cuboïdes comportant de grosses mitochondries et de nombreuses microvillosités, ce qui augmente la surface d'échange avec la lumière et accroît la libération d'énergie métabolique qui sera utilisée dans le processus de réabsorption au niveau du tubule proximal. La partie descendante de l'anse de Henlé est recouverte d'un épithélium squameux simple qui facilite le passage de l'eau, alors que dans la partie ascendante les cellules deviennent cubo-cylindriques. Au niveau du TCD les cellules sont semblables à celle du TCP mais présentent très peu de microvillosités en surface. Le tube collecteur diffère des autres tubules des néphrons et comporte deux types de cellules bien distinctes : les cellules principales et les cellules intercalaires (figure 2).

Les cellules principales (ou cellules bêta) sont les plus nombreuses et ont une forme cubique avec peu de microvillosités. Ces cellules contribuent aux échanges de l'eau et des électrolytes et sont la cible de la régulation par la vasopressine (AVP). Les cellules intercalaires (ou cellules alpha) interviennent dans le maintien de l'équilibre acide-base et la régulation du pH.

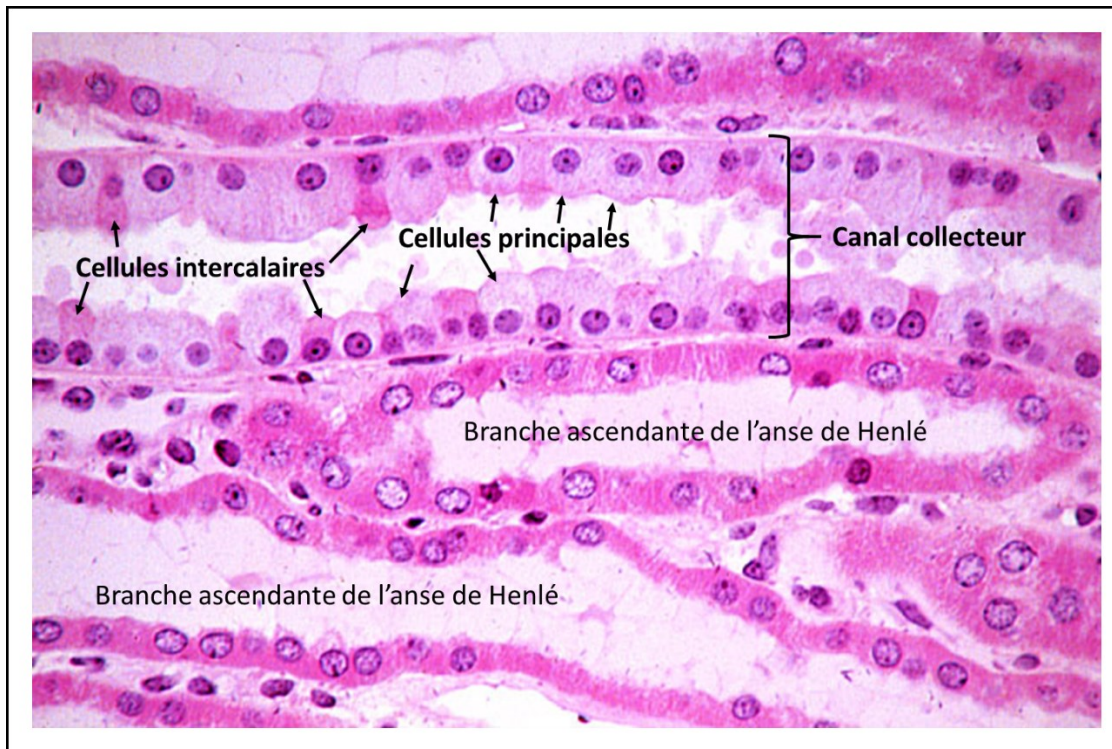


Figure 2. Le canal collecteur du rein. Image histologique d'un canal collecteur tapissé d'une monocouche de cellules principales, plus nombreuses et de quelques cellules intercalaires. Modifié de (Vaughan, 2002).

1.2. Physiologie rénale :

1.2.1. La filtration glomérulaire : c'est la première étape dans le processus de la formation des urines. Il s'agit d'un phénomène purement mécanique dû à la pression hydrostatique élevée dans les glomérules, ce qui engendre un débit qui fait passer les liquides et solutés (eau, glucose, électrolytes, acides aminés, déchets azotés...) dans la chambre glomérulaire pour constituer un filtrat glomérulaire. Grâce à la perméabilité sélective de la membrane glomérulaire, les protéines et molécules dont la taille est supérieure à 7 nm ne peuvent pas accéder à la chambre glomérulaire (Guyton et Hall, 2000). Le débit de filtration glomérulaire est finement régulé par deux mécanismes :

1.2.1.1. Le mécanisme intrinsèque : il inclut l'autorégulation vasculaire myogène (ex : contraction des fibres musculaires lisses de la couche musculaire des capillaires en réponse à une pression artérielle élevée) et la rétroaction tubulo-glomérulaire. Cette dernière est gérée par les cellules de la *macula densa* situées dans l'appareil juxta-glomérulaire. Ces cellules ont la capacité de détecter les variations du débit urinaire et de la pression osmotique et d'émettre des signaux d'autorégulation faisant intervenir le système rénine-angiotensine.

1.2.1.2. Le mécanisme extrinsèque : ce mode de régulation est nerveux et hormonal. Il fait intervenir l'adrénaline et la noradrénaline qui, en situation de stress, entraînent une vasoconstriction des artéioles afférentes pour ainsi réduire le débit de filtration glomérulaire. En cas de baisse de la pression artérielle, le système nerveux active indirectement le système hormonal rénine-angiotensine. Son activation consiste en la sécrétion de rénine qui intervient dans la conversion de l'angiotensinogène en angiotensine et qui sera ensuite converti en angiotensine II. Ce dernier est un puissant vasoconstricteur qui stimule la contraction de la musculature lisse des vaisseaux et engendre donc une augmentation de la pression artérielle. L'angiotensine II stimule également la réabsorption du Na^+ par l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ dans les tubules rénaux et par la stimulation de la sécrétion d'aldostérone par les glandes surrénales.

1.2.2. La réabsorption tubulaire

Cette fonction permet la récupération de 99% du volume filtré à travers la membrane glomérulaire. Également, 99% des quantités de sodium et de chlore sont réabsorbés. Ce processus de récupération commence aussitôt que le filtrat glomérulaire atteint le TCP. Les substances réabsorbées prennent une voie transépithéliale et/ou para-cellulaire puis traversent la membrane basale, l'interstitium puis l'endothélium vasculaire pour se retrouver dans le courant circulatoire. La réabsorption se fait par des mécanismes passifs ou actifs en fonction de l'élément impliqué dans le transport. La réabsorption du Na^+ est par excellence le mécanisme qui consomme 80% de l'énergie dédiée au processus de

réabsorption active par le système tubulaire. Sa réabsorption fait intervenir la pompe Na^+/K^+ ATPase. Ce transport actif engendre un gradient chimique et facilite, avec le Na^+ , par transport actif secondaire et par transport passif d'autres éléments dont le glucose les acides aminés et certains ions et vitamines. Ce gradient soutient également le transport facilité des anions Cl^- et HCOO_3^- dont le but est d'équilibrer les charges négatives entre le plasma et le filtrat. L'eau est également soumise au mouvement du Na^+ dont la réabsorption active engendre un fort gradient osmotique entraînant avec lui les molécules d'eau qui passent à travers des pores membranaires appelés aquaporines (voir section aquaporines). Ces pores sont exprimés tout le long du tube rénal sauf au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé.

En fonction des besoins de l'organisme, c'est au niveau des tubes contournés distaux et collecteurs que s'effectue la réabsorption de l'eau et du NaCl . Cette réabsorption est dite fine, elle est contrôlée par plusieurs hormones dont les deux principales sont l'aldostérone et l'AVP. La sécrétion de cette dernière est régulée par les changements de l'osmolarité plasmatique détectable par les osmo-récepteurs au niveau du système nerveux central. Une augmentation de l'osmolarité plasmatique stimule les osmo-récepteurs et induit la sécrétion de l'AVP qui va entraîner une réabsorption accrue d'eau au niveau du tube collecteur (figure 3). Ainsi, les urines vont être plus concentrées. Le phénomène inverse se produit lorsque des conditions physiologiques ou pathologiques induisent une baisse de l'osmolarité plasmatique (figure 4). Le mécanisme d'action de l'AVP va être détaillé dans le chapitre vasopressine.

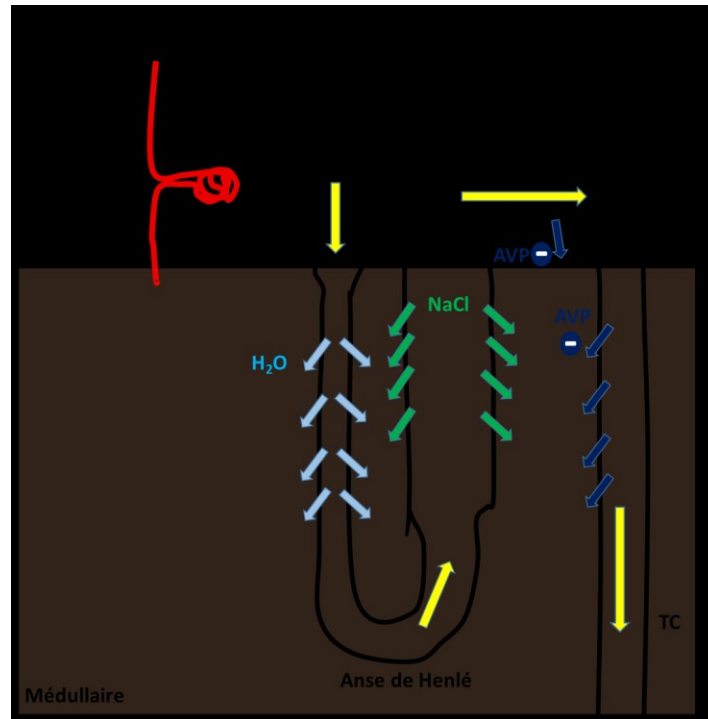


Figure 3. Schéma représentatif des mouvements d'eau et du NaCl le long du néphron.
 Sont représentés les mouvements passifs de l'eau dans le tube rénal (flèches bleu-clair), le transport actif du NaCl (flèches vertes) et la réabsorption de l'eau sous l'effet de l'AVP (flèches bleu-foncé). La direction du flux urinaire est indiquée par les flèches jaunes.
 TCP : tube contourné proximal. TCD : tube contourné distal. TC : tube collecteur.

1.2.3. Sécrétion tubulaire

Ce mécanisme permet à certaines substances comme l'urée, l'acide urique et certains ions comme le K^+ , H^+ et NH_4^+ , de passer des capillaires péri-tubulaires vers le filtrat. L'urine sera donc composée de substances filtrées et secrétées. Cette sécrétion va permettre d'éliminer des substances ne pouvant être filtrées par les glomérules, de réguler le pH et d'excréter les ions K^+ en excès.

1.2.4. Concentration des urines

Dans le but de maintenir une osmolarité des liquides de l'organisme autour de 300 mmol/kg, le rein a la capacité de concentrer les urines en fonction des variations des apports en eau et certains états pathologiques. Cette capacité repose sur le maintien d'un gradient cortico-papillaire grâce au système d'échange à contre-courant, à la sécrétion adaptée de l'AVP et à la perméabilité du canal collecteur aux mouvements d'eau.

1.2.4.1. Le système d'échange à contre-courant :

Ce système repose sur l'interaction entre les mouvements de deux liquides dans deux sens opposés et de la perméabilité sélective des branches de l'anse de Henlé. Il s'agit, d'une part, du filtrat au niveau de l'anse du néphron juxta-médullaire, et d'autre part du sang des vasa recta adjacents. C'est l'anse de Henlé qui joue un rôle majeur dans ce système car sa branche descendante permet la réabsorption de l'eau mais non des solutés alors que sa branche ascendante est perméable aux solutés et non à l'eau (figure 3). Le filtrat dans le TCP, encore iso-osmotique, une fois arrivé au niveau de la branche descendante de l'anse de Henlé va subir le passage massif de son eau, par osmose, vers l'interstitium, ce qui va faire augmenter l'osmolarité du filtrat quatre fois plus par rapport à celle du plasma, soit 1200 mmol/kg. Ce mouvement d'eau est dû à l'augmentation progressive de l'osmolarité du milieu interstitiel le long de la branche descendante de l'anse de Henlé. Arrivé à la branche ascendante, c'est le NaCl qui est réabsorbé et non l'eau ce qui entraîne une dilution du filtrat à l'approche du cortex rénal. Donc c'est le gradient osmotique médullaire qui permet les échanges d'eau et des solutés au niveau de l'anse de Henlé. Le maintien de ce gradient médullaire est assuré par les échanges avec

le sang à travers les pores des vasa recta mais aussi par la diffusion de l'urée au niveau du tube collecteur (Focosi, 2014).

1.2.4.2. Action de l'AVP et perméabilité du tube collecteur à l'eau

Le contrôle de la réabsorption de l'eau par le tube collecteur est principalement régulé par l'AVP via les aquaporines. À l'état basal, les aquaporines sont très peu exprimées au niveau du tubule collecteur. Par contre, en cas de déshydratation, l'AVP va être sécrétée et aura pour action d'augmenter la perméabilité à l'eau en accroissant l'expression, la translocation et la fonction des aquaporines, notamment celles de l'aquaporine 2 au niveau des cellules principales (voir section aquaporines). Ainsi, l'AVP rend l'épithélium des tubules collecteurs perméable à l'eau et augmente la réabsorption passive de l'eau vers le tissu interstitiel. Cet effet entraîne une rétroaction négative sur la sécrétion de l'AVP (figure 4). En présence d'AVP, l'eau est soustraite du filtrat, une urine concentrée est donc émise (maximum 1200mOsm/l). Par contre, en l'absence d'AVP une urine diluée est émise (minimum 50mOsm/l) puisque la perméabilité du tube collecteur à l'eau est dépendante de l'AVP.

1.2.5. Fonctions endocrines du rein

Le rein assure aussi une fonction endocrinienne en synthétisant l'érythropoïétine ou en produisant de la vitamine D. Il intervient également dans le métabolisme d'agents vasoactifs tel que les prostaglandines, les kinines, et le peptide natriurétique atrial.

L'érythropoïétine est une glycoprotéine riche en acide sialique libérée par le rein dans la région corticale profonde. C'est un facteur de croissance impliqué dans la stimulation de l'érythropoïèse médullaire des os.

Le rein joue un rôle important dans le processus d'hydroxylation de la forme inactive de la vitamine D donnant ainsi le métabolite biologiquement actif, le 1,25-dihydroxyvitamine D (Liu et al., 2016). La vitamine D active va permettre d'augmenter l'absorption digestive du calcium alimentaire et la résorption osseuse du calcium.

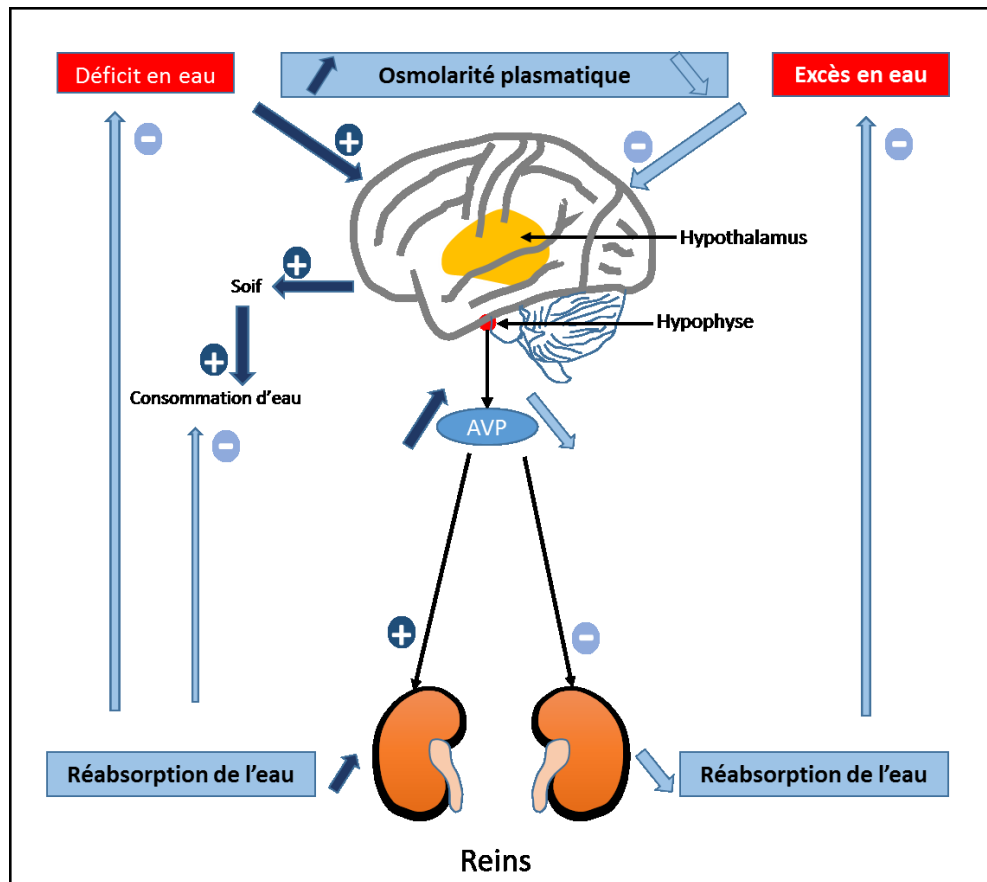


Figure 4. Équilibre hydrique et vasopressine. L'AVP joue un rôle majeur dans la régulation de l'eau par les reins. Lors de la déshydratation, la sécrétion hypophysaire d'AVP augmente. Celle-ci rend l'épithélium des tubes collecteurs perméable à l'eau et ainsi augmente la réabsorption passive de l'eau vers le tissu interstitiel. La rétention d'eau entraîne une rétroaction négative pour réduire les apports d'eau et la baisse de l'osmolarité plasmatique qui en découle réduit la libération de l'AVP au niveau central. Lors de surcharge hydrique, une inhibition de la sécrétion d'AVP est observée. L'épithélium des tubes collecteurs devient imperméable à l'eau qui sera ainsi éliminée dans l'urine.

2. La vasopressine :

Dénommée également l'hormone antidiurétique (ADH), la vasopressine ou arginine vasopressine (AVP) est un petit polypeptide ne comportant que 9 acides aminés mais dont l'action est très importante pour l'équilibre hydro-sodé de l'organisme. Le nom vasopressine revient à l'arginine comme huitième acide aminé dans la séquence

peptidique. Cet acide aminé interagit avec le résidu D103 du récepteur V1 et V2 (Ufer et al., 1995). Les deux groupes cystéine des acides aminés 1 et 6 sont reliés par un pont disulfure donnant une configuration cyclique à l'AVP. La rupture de ce pont disulfure par réduction ou par oxydation entraîne la perte de la fonction de l'hormone (Melmed, 2011).

2.1. Gène, synthèse et lieu de stockage :

L'AVP est codée par le gène *AVP* situé, chez l'homme, sur le chromosome 20 qui est juxtaposé au gène de l'ocytocine, ce qui suggère leur origine du même gène ancestral.

L'AVP est synthétisée au niveau des neurones magnocellulaires situés dans les cellules des noyaux paraventriculaires et supraoptiques de l'hypothalamus. La traduction de l'ARNm par les ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux (RER) aboutit à la synthèse d'une pré-pro-hormone de 164 acides aminés (figure 5). Après son repliement au niveau du RER, cette protéine subit ensuite plusieurs modifications post-traductionnelles (glycosylation, protéolyse, amidation) pendant son voyage dans la voie sécrétrice entre le RER et les vésicules sécrétoires (Acher et al., 2002). Au total 4 cascades enzymatiques sont nécessaires pour aboutir à la forme mature de l'AVP. La pré-pro-hormone est d'abord glycosylée au niveau de son extrémité c-terminale pour être transportée dans des vésicules sécrétoires le long de l'axone. Durant son voyage dans l'axone, cette forme précurseur subit deux clivages : un premier clivage du peptide signal, donne naissance à la pro-vasopressine. Le deuxième clivage aboutit à la forme mature de la vasopressine, prête pour la sécrétion. Ce clivage sépare la vasopressine de la copeptine et de la neurophysine II (Russell et al., 1980).

L'AVP est stockée dans des granules sécrétoires au niveau des extrémités des axones situés dans la post-hypophyse. L'afflux de Ca^{2+} intracellulaire entraîne la fusion de ces granules avec la membrane plasmique de l'axone et permet la libération de l'AVP dans la circulation sanguine. Cette sécrétion est stimulée par l'hyperosmolarité plasmatique, la déplétion volémique et aussi par la baisse de la pression artérielle. De façon moindre, la sécrétion de l'AVP peut également être provoquée par la morphine, l'angiotensine II et

par l'état de stress (Firemark et Weitzman, 1979; Rowe et Parr, 1980). Des études ont montré que l'AVP est également produite par les neurones parvocellulaires de l'hypothalamus (Dong et al., 1997; Morgenthaler, 2010; Polito et al., 2011), qu'elle est directement relâchée dans le système porte hypophysaire et agit immédiatement sur les cellules endocrines de l'adénohypophyse. Cette action se fait en synergie avec la CRH (*corticotropin-releasing hormone*) et induit la production de l'ACTH (*adrenocorticotropic hormone*). Elle est impliquée dans l'augmentation du cortisol plasmatique en réponse au stress.

L'action de l'AVP se fait par la stimulation de récepteurs membranaires appartenant à la famille des protéines couplées aux protéines G, appelés récepteurs de la vasopressine. À ce jour 3 types de récepteur à la vasopressine sont connus : V1 (V1a), V2 et V3 (V1b). Ils sont codés respectivement par les gènes *AVPR1A*, *AVPR2* et *AVPR1B* (Lolait et al., 1992; Saito et al., 1995; Thibonnier et al., 1996). Ces récepteurs diffèrent par leur localisation tissulaire, leur fonction et aussi leur mode d'action. La vasopressine peut activer également les récepteurs OTR (Oxytocin receptor) de l'ocytocine et le récepteur purinergique P₂ (P₂R) dans les cellules endothéliales (Thibonnier et al., 1998; Zenteno-Savin et al., 2000).

2.2. Récepteurs et fonction de l'AVP :

Le récepteur V₁ (V_{1a}R) est essentiellement exprimé dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins mais il est aussi présent au niveau du myomètre, des hépatocytes et des cardiomyocytes. Sa stimulation par l'AVP entraîne principalement une vasoconstriction et l'hypertrophie du myocarde. Cet effet est dû à la liaison du récepteur V₁ à la protéine G_q qui active PLC_β (phospholipase B) qui entraîne l'hydrolyse du phosphatidylinositol et l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire (Aiyar et al., 1986; Finley et al., 2008). V₁R est également présent dans les cellules interstitielles de la médulla rénale. À ce niveau l'AVP va entraîner une baisse du flux sanguin dans la médulla interne.

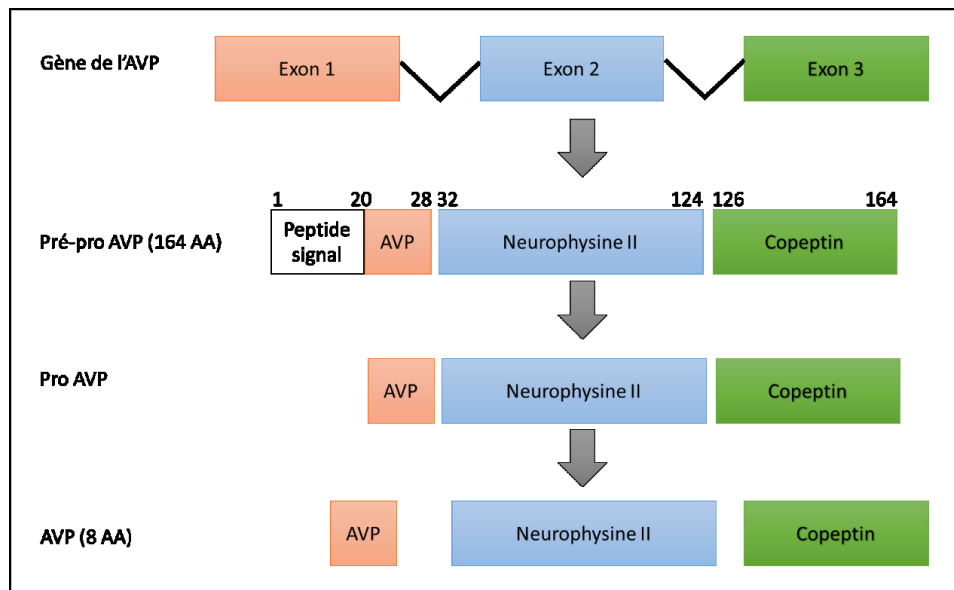


Figure 5. Processus de la synthèse de l'AVP. Le gène de l'AVP situé sur le chromosome 20 comporte 3 exons qui codent pour une pré-pro-hormone de 164 acides aminés (AA). Les nombres indiquent la position des AA dans la protéine précurseur. L'AVP mature ne comporte que 8 AA. Elle se sépare de la neurophysine II et la copeptine, qui sont sécrétées par les neurones dans les mêmes vésicules.

Le récepteur V_3R ($V_{1b}R$) présente une forte homologie avec le $V_{1a}R$, mais il est présent uniquement au niveau de la partie antérieure de la glande hypophyse (Rousseau-Merck et al., 1995) et sa liaison avec l'AVP entraîne l'augmentation de la sécrétion de l'ACTH via l'activation de la PKC.

Le récepteur V_2R est exprimé à la surface des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et au niveau rénal. L'expression de l'ARNm du récepteur V_2R a été observée au niveau de plusieurs parties du néphron, mais de manière plus importante dans le tubule collecteur (Terada et al., 1993). Par des techniques d'immunohistochimie, plusieurs études ont montré que le V_2R est situé au niveau de la membrane basolatérale des cellules principales du canal collecteur du rein (Sarmiento et al., 2005). À l'instar des récepteurs V_{1a} et V_{1b} qui sont couplés à la protéine G_q , la séquence peptidique du récepteur V_2R au niveau de la queue cytoplasmique lui confère une sélectivité de liaison à la protéine G_s (Martin et al., 2003). Des mutations dans la séquence peptidique de ce

récepteur sont à l'origine de diabète insipide néphrogénique (Figure 6). La liaison de l'AVP à son récepteur V_2R entraîne, via la protéine G_s , l'activation de l'adényl cyclase qui catalyse l'hydrolyse de l'ATP en l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) intracellulaire (Finley et al., 2008). C'est par l'intermédiaire du récepteur V_2R que l'AVP exerce son action antidiurétique permettant d'augmenter la réabsorption de l'eau au niveau des tubules collecteurs. Il est bien connu que l'AVP régule la balance hydrique en exerçant ses principaux effets sur la réabsorption de l'eau selon deux mécanismes distincts : un mécanisme non génomique à court terme et une action génomique à long terme.

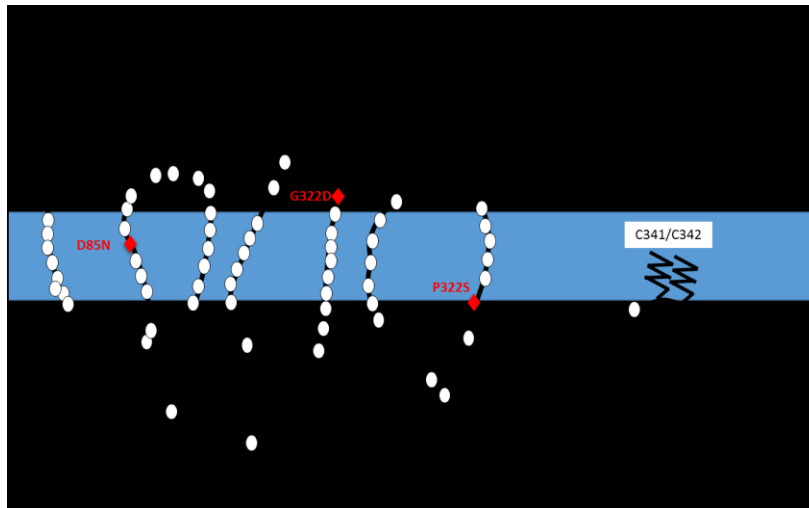


Figure 6. Représentation schématique de la structure du récepteur V_2R de l'AVP. C'est une protéine du groupe RCPG à 7 domaines transmembranaires. Elle est composée de 371 acides aminés. Le C terminal est du côté intracellulaire et le N terminal est extracellulaire. La protéine comporte un site de glycosylation (N22), et deux sites de palmitoylation (C341/C342) permettant son ancrage à la membrane cytoplasmique. Les cercles en blanc représentent la localisation des acides aminés fréquemment mutés dans le diabète insipide néphrogénique, alors que les acides aminés en losange rouge sont souvent mutés dans le diabète insipide néphrogénique partiel.

2.3. Action à court terme de l'AVP (non génomique) sur la réabsorption de l'eau :

L'activation de l'AMPC par l'AVP entraîne une augmentation du nombre de molécules tétramériques d'AQP2 au niveau de la membrane apicale des cellules principales du canal collecteur. Cette augmentation est reflétée en immunohistochimie par un fort marquage membranaire de l'AQP2 observé après quelques minutes de stimulation par l'AVP (Moeller et al., 2011). La liaison de l'AVP à son récepteur V₂R entraîne l'augmentation de l'AMPC intracellulaire qui active le PKA (protéine kinase A). Ce dernier va promouvoir la fusion des vésicules comportant l'AQP2 à la membrane apicale et va diminuer l'internalisation de l'AQP2 dans les vésicules d'endocytoses. D'autre part, l'AVP entraîne une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire par l'intermédiaire de l'AMPC et la protéine d'échange Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*), mais aussi par un autre mécanisme impliquant la PLC_β et la formation de l'IP3 (inositol triphosphate). Ce dernier mécanisme n'est pas encore complètement connu. Ce calcium va aider la translocation de l'AQP2 vers la membrane cytoplasmique, mais le rôle exact et le mécanisme moléculaire sont encore mal connus (Moeller et Fenton, 2012).

2.4. Action à long terme (génomique) de l'AVP sur la réabsorption de l'eau :

L'AVP entraîne aussi, par l'intermédiaire de l'AMPC, l'activation et la translocation nucléaire du facteur CREB (*cAMP response element binding protein*) de c-jun/cfos, qui vont se lier à une séquence spécifique appelée CRE (*cAMP response element*) située sur le promoteur du gène de l'AQP2 induisant ainsi l'augmentation de la transcription (effet génomique de l'AVP) et la production de l'ARNm de l'AQP2 (figure 7) (Moeller et al., 2011; Kortenoeven et al., 2012). La stimulation de l'expression de l'AQP2 a été démontrée dans la lignée de cellules rénales mpkCCD_{c14} (*mouse immortalized cortical collecting duct principal, clone 14*) après trois heures et jusqu'à quatre jours de traitement avec 1 nM d'AVP (Hasler et al., 2002; Kortenoeven et al., 2012). Il est à noter que cette action de l'AVP se fait par sa liaison au récepteur V₂R, pour lequel elle a une plus grande affinité que les récepteurs V₁R et V₃R (Nicole-Barousse et al., 2001).

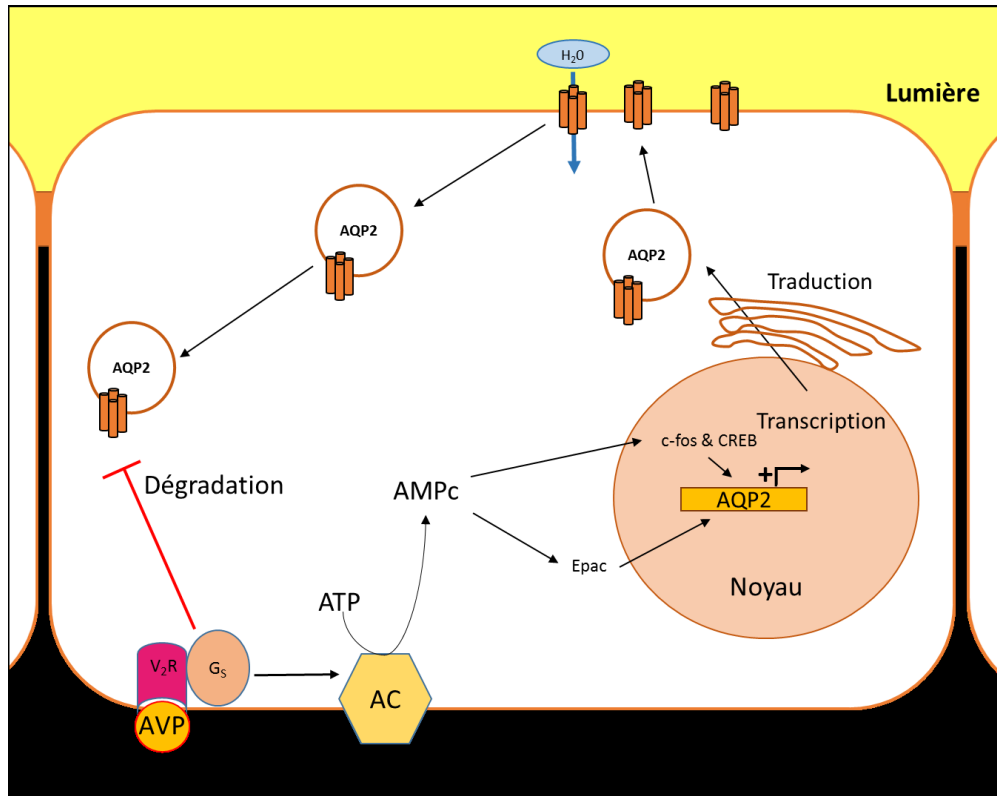


Figure 7. Régulation transcriptionnelle de l'AQP2 suite à l'action de l'AVP. L'AVP via l'AMPc entraîne une augmentation de l'expression et de l'abondance de l'AQP2 dans la cellule. L'AMPc active c-fos et CREB, mais aussi Epac, qui vont entrer au noyau pour se lier aux sites AP1 et CRE sur le promoteur du gène de l'AQP2 et entraîner une augmentation de la transcription de l'ARNm de l'AQP2 et donc augmenter son expression. L'AVP empêche également la dégradation de l'AQP2 ce qui contribue à son abondance dans la cellule.

3. Les aquaporines :

Les aquaporines sont des protéines à six domaines transmembranaires de petit poids moléculaire qui sont présentes dans quasiment toutes les espèces. Elles sont insérées dans la bicouche lipidique hydrophobe de la membrane plasmique pour former des pores permettant le passage d'eau et de glycérol à travers cette membrane cellulaire. Les deux extrémités amine et carboxyle de la protéine se terminent au niveau du cytoplasme (figure 8). Les AQPs comportent deux domaines NPA (N pour asparagine, P pour proline et A pour alanine) largement conservés et dont la disposition de part et d'autre de la protéine forme la structure poreuse perméable à l'eau (Nielsen et al., 2002; Noda et al., 2010). Les AQPs forment des homo-tétramères indépendants transportant l'eau de façon individuelle.

3.1. Différents types d'aquaporines :

Il existe plusieurs types d'AQPs, 13 sont présentes chez l'homme dans différents tissus. Les aquaporines sont subdivisées fonctionnellement en trois grandes familles ou classes (Ishibashi et al., 2009):

- La classe I regroupe les AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 et l'AQP8 qui sont sélectives à l'eau. L'AQP6, également perméable au nitrate et l'AQP8 aux ROS, font exceptions dans ce groupe.
- La classe II est appelée également les glycéroportines, et regroupe les AQP3, AQP7, AQP9 et l'AQP10 qui sont perméables à l'eau mais aussi au glycérol et à l'urée.
- La classe III : ce sont l'AQP11 et l'AQP12 qui constituent le groupe des super-aquaporines. L'AQP11 transporte de l'eau mais elle a aussi d'autres rôles qui restent encore controversés. Elle est exprimée de façon ubiquitaire alors que l'AQP12, qui présente des homologies de séquence avec l'AQP11, est exprimée uniquement dans les cellules acineuses pancréatiques mais son rôle exact est inconnu.

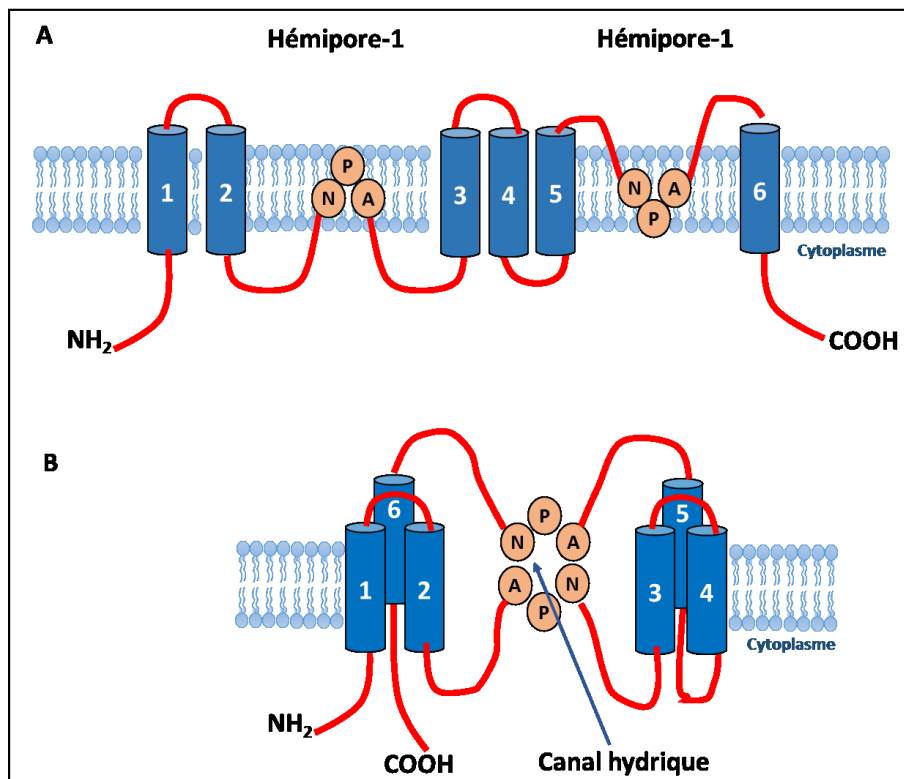


Figure 8. Représentation schématique de la structure et l'organisation des aquaporines.
A. Les aquaporines ont 6 domaines transmembranaires interconnectés par 3 boucles extracellulaires, et deux intracellulaires. Les extrémités NH₂ et COOH sont du côté cytosolique. **B.** Les deux domaines NPA (N pour asparagine, P pour proline et A pour alanine) se disposent de façon à créer la structure poreuse perméable à l'eau (canal hydrique). Le schéma montre l'AQP1 comme exemple de la structure des aquaporines.

- Parmi les aquaporines citées plus haut, sept aquaporines sont exprimées de façon différentielle dans le glomérule et le long du néphron (figure 9). Du glomérule au tube collecteur ces aquaporines sont distribuées ainsi :

-AQP1 : c'est la première AQP découverte dans les érythrocytes où elle joue un rôle dans le transport du CO₂. Elle est largement exprimée dans les différents types cellulaires. Sa présence dans les cellules endothéliales est importante pour l'angiogenèse et la migration cellulaire. Dans le rein l'AQP1 est présente le long du tube contourné proximal et la branche descendante de l'anse de Henlé (Kortenoeven et Fenton, 2014). Elle est exprimée au pôle apical et basolatéral des cellules tapissant ces deux portions du tube rénal. Comme elle est impliquée dans le transport de l'eau à ce niveau, son invalidation chez les souris entraîne un problème dans la concentration des urines (Ma et al., 2000).

-AQP11 : sa présence est vitale pour le développement embryonnaire car son invalidation chez les souris résulte en une polykystose rénale sévère et fatale (Morishita et al., 2005). Dans le rein elle est exprimée au niveau du tube contourné proximal, plus précisément dans le réticulum endoplasmique des cellules qui tapissent sa paroi. Elle est impliquée dans le transport de l'eau et la régulation du pH. La microscopie électronique a permis de montrer que les vacuoles kystiques dans la polykystose rénale sont localisées au niveau du réticulum endoplasmique des cellules du TCP. Le mécanisme exact de la formation de ces vacuoles est encore inconnu.

-AQP7 : présente au niveau des microvillosités de la membrane apicale des cellules épithéliales du TCP (Kortenoeven et Fenton, 2014). Elle est responsable de la réabsorption de l'eau et du glycérol. Les souris invalidées pour l'AQP7 ont des urines riches en glycérol. L'AQP7 est importante également pour la libération du glycérol à partir des adipocytes et entraîne une augmentation de la masse grasseuse chez les souris invalidées (Hibuse et al., 2005).

- AQP3 : elle est observée au niveau du pôle basolatéral des cellules principales du TCP et est responsable du transport de l'eau de la cellule vers le milieu interstitiel (Kortenoeven

et Fenton, 2014). Elle est donc importante dans le processus de concentration des urines (Ma et al., 2000; Hara et Verkman, 2003). Dans l'épithélium cutané, l'AQP3 est impliquée dans le transport de l'eau et du glycérol et est importante pour l'hydratation de la peau (Ishibashi et al., 2009). Dans le côlon elle est impliquée dans la régénération épithéliale dans les colites ulcéreuses (Silberstein et al., 1999).

- AQP4 : son profil d'expression est similaire à celui de l'AQP3 avec quelques différences rendant son absence moins dommageable que celle de l'AQP3, car elle est présente uniquement au pôle basal des cellules principales de la partie médullaire du tube collecteur (Kortenoeven et Fenton, 2014). L'AQP4 est aussi exprimée dans les cellules gliales, les cellules musculaires et dans les cellules principales de la muqueuse gastrique (Levin et al., 2006)

-AQP6 : initialement décrite comme un homologue de l'AQP2. Dans le rein, elle est seulement présente au niveau des cellules intercalaires du tube collecteur, mais son rôle précis dans ces cellules est encore méconnu car sa localisation subcellulaire n'est pas bien établie. On lui a attribué un rôle dans le transport de l'eau et de certains anions comme les nitrates (Kortenoeven et Fenton, 2014).

-AQP2 : Elle est connue pour être régulée par l'AVP et permet la réabsorption de l'eau au niveau du tube collecteur du rein. Ce concept de canal hydrique modulé par l'AVP a été adopté dès les années 60 d'après les études menées par Orloff et Handler sur la vessie du crapaud et la peau des amphibiens (Orloff et Handler, 1967). Des études subséquentes ont démontré que des particules se regroupaient à la membrane apicale des cellules de la vessie du crapaud en réponse à la stimulation par l'AVP. Par la suite d'autres chercheurs ont purifié une protéine de 28 kDa à partir des membranes d'érythrocytes et dont le séquençage a permis d'isoler un cDNA correspondant à la protéine CHIP28 (*channel-like integral protein*). C'est l'injection de l'ARNm de cette protéine dans les ovocytes de *xenopus* qui a permis de découvrir la fonction canal hydrique de cette protéine (Preston et al., 1992). Durant les années 90, Kihara et son équipe ont cloné un homologue identique à 42% avec la protéine CHIP28. Subséquemment, des études fonctionnelles et

d'expression ont démontré qu'il s'agissait d'un canal hydrique présent dans le tube collecteur, où CHIP28 est absente (Fushimi et al., 1994). Ce canal a été initialement dénommé CHIP28-CD puis définitivement appelée aquaporine 2. CHIP28 a été alors rebaptisée AQP1. Plusieurs études ont montré par la suite que l'expression et la localisation membranaire de l'AQP2 avec l'AQP11 dans le tube contourné proximal sont régulées par l'AVP (Nielsen et al., 1995; Yamamoto et al., 1995) (Sabolic et al., 1995; Sun et al., 2002).

3.2. Gène de l'AQP2 :

Le gène de l'AQP2 chez l'homme est situé sur le chromosome 12 (Sasaki et al., 1994). Il présente 91% d'homologie de séquence avec le gène de l'AQP2 du rat, il comporte quatre exons et code pour 271 acides aminés. Les souris dont le gène de l'AQP2 est invalidé ne survivent pas en raison de la déshydratation sévère, alors que chez l'homme son absence peut être compensée par une prise d'eau plus fréquente (Ishibashi et al., 2009). Plus de 43 mutations ont été répertoriées dans ce gène causant différentes formes dominantes et récessives de diabète insipide néphrogénique. Ces mutations se traduisent par le remplacement de plusieurs acides aminés dans la protéine (figure10). Ces mutations rendent l'AQP2 non fonctionnelle causant la perte d'eau et l'incapacité des reins à concentrer les urines (Noda et al., 2010).

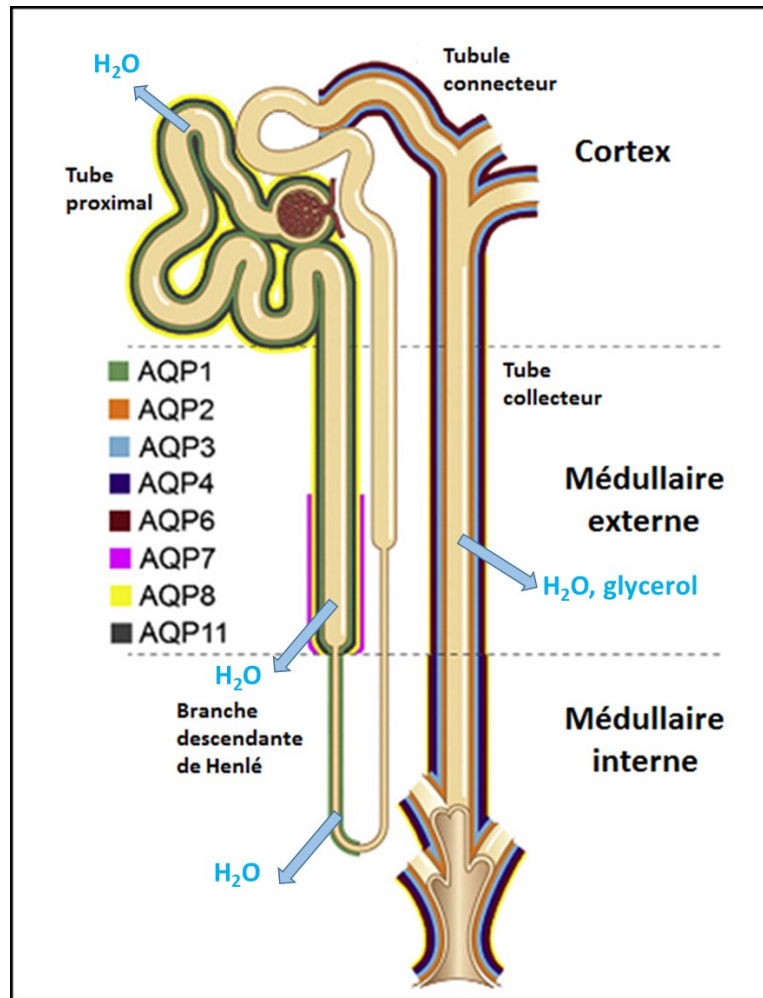


Figure 9. Expression différentielle des aquaporines dans le tube rénal. L'AQP1 (en vert) est présente dans le tube proximal et la branche descendante de l'anse de Henlé mais aussi dans les vasa recta facilitant les mouvements de l'eau. L'AQP2 (orange) est localisée dans le pôle apical des cellules principales du tube collecteur, alors que l'AQP3 (bleu clair) et l'AQP4 (bleue foncé) sont présentes dans le pôle basolatéral des cellules de ce tube. L'AQP7 (violet) est observée dans le tube contourné proximal. Par ailleurs les AQP6 (rouge), AQP8 (jaune) et AQP11 (gris) sont exprimées dans les membranes intracellulaires seulement. L'AQP6 est présente dans les cellules intercalaires du tube collecteur et des tubes connecteurs, l'AQP8 est observée de façon faible dans le tube collecteur et elle est fortement présente dans le tube contourné proximal. Les flèches bleues indiquent les segments où l'eau est réabsorbée. Modifié de (Kortenoeven et Fenton, 2014)

3.3. Particularités structurales et localisation de l'AQP2 :

- L'AQP2 est une protéine de 29 kDa avec une forme de haut poids moléculaire de 35 à 50 kDa correspondant à l'ajout d'une N-glycosylation sur l'asparagine, acide aminé 124 de la protéine (Sasaki, 2012). Elle a une structure semblable aux autres aquaporines avec 6 domaines transmembranaires comprenant 2 motifs NPA, les segments N-terminal et C-terminal sont intracellulaires et un pore permettant le passage de l'eau (figure 11).

Étant la cible de l'AVP, il n'est pas étonnant que l'AQP2 soit exprimée au niveau du rein et plus spécifiquement dans la membrane apicale et les vésicules subapicales des cellules principales du canal collecteur du rein. Ces mêmes cellules expriment du côté basolatéral le récepteur V2R de l'AVP. L'AQP2 est également retrouvée dans d'autres organes comme les testicules (dans le rete testis) mais aussi dans l'oreille interne suggérant son implication dans l'homéostasie du sac endolymphatique (Sasaki, 2012).

3.4. Régulation de l'expression et de la localisation subcellulaire de l'AQP2 :

La balance hydrique de l'organisme chez l'homme peut subir des variations aiguës et chroniques. Un bilan négatif en eau, déterminé par une baisse des apports ou une perte accrue en eau entraîne la libération de l'AVP dans la circulation sanguine qui lui permet d'agir sur ces cibles dont l'AQP2. Dans le cas d'une hydratation normale, l'AQP2 est confinée dans les vésicules cytoplasmiques des cellules du canal collecteur. Quand le corps a besoin de récupérer l'eau filtrée, l'AVP va réguler l'AQP2 selon deux mécanismes : un mécanisme rapide à court terme qui va augmenter l'adressage membranaire des AQP2 déjà présentes dans les vésicules subapicales, et un mécanisme à long terme qui entraîne l'augmentation de la traduction de l'ARNm de l'AQP2 ce qui augmente les quantités de cette protéine dans la membrane apicale des cellules principales du canal collecteur, qui devient alors perméable à l'eau et permet donc sa récupération (voir chapitre AVP).

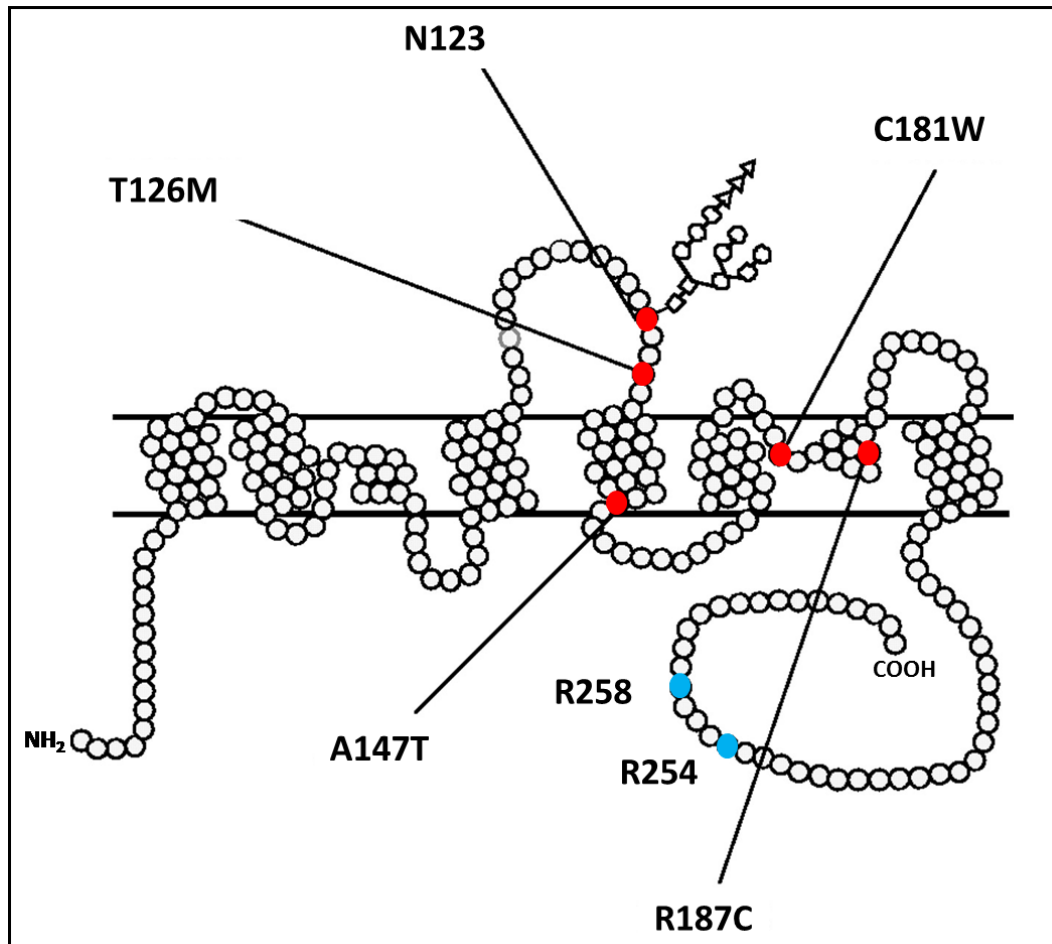


Figure 10. Structure schématique de l'aquaporine 2 montrant les différentes mutations à l'origine du diabète insipide néphrogénique. L'AQP2 a six domaines transmembranaires reliés par quatre boucles, deux en intracellulaire et deux en extracellulaire. Les deux terminaisons NH₂ et COOH sont du côté cytoplasmique. Les acides aminés pouvant être mutés dans le DIN (diabète insipide néphrogénique) autosomique récessif sont colorés en rouge. Les délétions sont également en rouge. En bleue sont les acides aminés qui sont à l'origine du DIN autosomique dominant. Les délétions sont également montrées en bleue. Modifié de (Buck et al., 2004).

Une fois liée à son récepteur V₂R exprimé dans la membrane basolatérale des cellules principales du tube collecteur, l'AVP entraîne l'augmentation de la production d'AMP_c qui va activer la PKA. Cette protéine kinase va phosphoryler la sérine 256 de l'AQP2 ce qui favorise la fusion des vésicules subapicales contenant l'AQP2 vers la membrane cytoplasmique (figure 12). Une fois l'effet de l'AVP est levé, l'AQP2 sera internalisée au cytoplasme et la cellule devient imperméable à l'eau. Ce processus consiste en la fusion des vésicules d'internalisation avec l'endosome précoce exprimant le '*Early Endosome Anti-gene 1*', et subséquemment l'AQP2 sera transférée dans les vésicules de stockage qui expriment Rab11 (Takata et al., 2008). Pour que l'AQP2 puisse être adressée vers la membrane cytoplasmique, au moins trois des quatre monomères d'AQP2 doivent être phosphorylés. D'autre part, il a été rapporté que l'activité de phosphorylation de la PKA est assistée par des molécules qui l'acheminent vers une localisation spécifique dans la cellule. Ces molécules sont appelées les AKAPs (*protein kinase A anchoring proteins*). Pour l'AQP2, ce sont les AKAP-18 et AKAP-18δ qui sont impliquées dans la phosphorylation de l'AQP2 par la PKA et son transfert vers la membrane cytoplasmique (Klussmann et al., 1999). Indépendamment de la PKA, la sérine 256 peut être également phosphorylée par la Golgi caséine Kinase, qui permet son transfert du réticulum endoplasmique vers le system Golgien (Procino et al., 2003). Une autre équipe de recherche a montré que la voie du GMP phosphodiesterase peut être également impliquée dans le processus d'adressage membranaire de l'AQP2 (Bouley et al., 2005).

La phosphorylation de l'AQP2 sur la sérine 256 est la plus importante et la plus étudiée, mais il existe trois autres sites de phosphorylation connus au niveau de l'extrémité COOH de l'AQP2 : les sérines 261, 264 et 269 (figure 11). L'AVP peut entraîner la phosphorylation des sérines 261 et 264. Le rôle de la phosphorylation de la sérine 264 est similaire à celui de la sérine 256 mais celui de la sérine 261 est encore controversé. La phosphorylation de la sérine 269 permet la rétention de l'AQP2 au niveau de la membrane cytoplasmique. Cette sérine empêche l'interaction de l'AQP2 avec la machinerie d'endocytose (Moeller et al., 2011). La phosphorylation des sérines 261, 264 et 269 dépend de la

phosphorylation préalable de la sérine 256 alors que la phosphorylation de cette dernière ne dépend d'aucune phosphorylation des autres sérines (Moeller et al., 2009)

La mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire peut entraîner une augmentation de la localisation de l'AQP2 dans la membrane apicale des cellules principales du canal collecteur. Ce calcium est modulé par l'action de l'AVP (Moeller et Fenton, 2012). L'AVP entraîne la libération du Ca^{2+} à partir des citernes intracellulaires, soit par l'activation de la PLC_β et la formation de l' IP_3 , soit via l'activation de l'AMPc. Ce dernier joue ce rôle par l'intermédiaire de l'Epac. L'implication précise du Ca^{2+} dans le transport de l'AQP2 est non complètement élucidé, mais une étude a montré que la mobilisation de ce Ca^{2+} intracellulaire par l'AMPc pourrait impliquer l'action de la calmoduline et de la MLCK (*Myosin light-chain kinase*) (Balasubramanian et al., 2008).

D'autres facteurs ont été cités comme régulateurs ou affectant la mobilisation et la localisation de l'AQP2 dans la cellule. L'aldostérone peut induire une augmentation de la localisation de l'AQP2 dans la membrane (de Seigneux et al., 2007), alors que la prostaglandine E2 et la dopamine entraînent l'internalisation de l'AQP2 indépendamment de sa phosphorylation (Nejsum et al., 2005).

L'AQP2 peut se lier à un complexe protéique associé au cytosquelette d'actine et qui joue un rôle important dans la régulation du trafic de l'AQP2 dans la cellule. La γ -actine et la tropomyosine sont parmi ces protéines. En condition d'hydratation normale, l'AQP2 est liée à la γ -actine alors que la F-actine est stabilisée par TM5b (tropomyosine-5b), ceci forme un réseau qui empêche la translocation de l'AQP2 vers la membrane apicale de la cellule. Suite à une déshydratation, l'AVP va activer la production d'AMPc ce qui entraînera la phosphorylation de l'AQP2 et sa libération de la γ -actine puis son association au TM5b. Le réseau de la F-actine devient alors instable et permet la libération de l'AQP2 et son adressage vers la membrane apicale (figure 13). En plus d'agir comme barrière à la translocation de l'AQP2, les fibres d'actine peuvent servir comme des câbles de direction participant à l'acheminement des vésicules transportant l'AQP2. Il est très probable que ce sont les molécules de myosine et tropomyosine qui interviennent dans la

réorganisation des filaments d'actine en un maillage de filaments réalisant une barrière à un réseau de câble de transport. L'évènement final de l'adressage de l'AQP2 vers la membrane apicale consiste en la fusion des vésicules avec cette membrane. Ce mécanisme fait intervenir le complexe SNARE (SNARE est une famille qui contient également les protéines vAmP-2, SNAP-23, syntaxin-3 et syntaxin-4). Les vésicules de transport contiennent v-SNARE qui va se lier à t-SNARE qui est déjà attachée à la membrane apicale. Ce mécanisme nécessite l'implication du facteur ATPase NSF (*N-ethylmaleimide sensitive factor*). Ce mode de transport impliquant les SNAREs est inhibé par le facteur Munc18 (*Mammalian uncoordinated-18*).

Dès que la stimulation de l'AVP est terminée, l'AQP2 est observée dans les vésicules d'endocytose associées à la clathrine. Ce mécanisme fait intervenir la protéine hsp70 (*Heat Shock Protein 70*), connue pour être associée aux vésicules de clathrine, et qui va se lier à l'extrémité COOH de l'AQP2. L'AQP2 subit une ou plusieurs ubiquitination sur la lysine 270. Cette réaction se déclenche dès l'arrêt de la stimulation par l'AVP et intervient dans l'internalisation et la dégradation de l'AQP2 par voie lysosomale, qui est facilitée par LIP5 impliquée dans la formation du corps multivésiculaire (van Balkom et al., 2009).

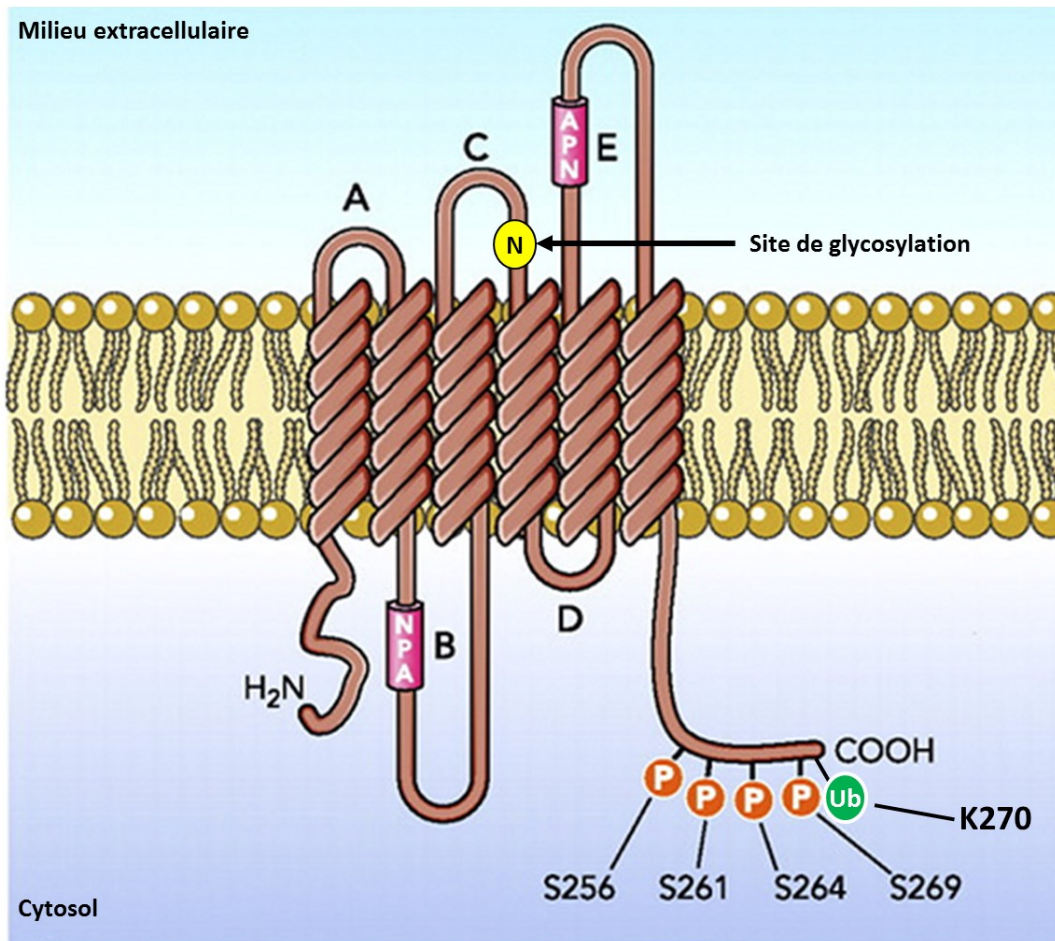


Figure 11. Représentation schématique des principaux sites de phosphorylation de l'AQP2. Sont représentées les sérines qui peuvent être phosphorylées au niveau de l'extrémité COOH. Elles sont indispensables dans l'adressage membranaire de l'AQP2 suite aux effets de l'AVP. Noter la présence, du côté extracellulaire, d'un site de glycosylation au niveau de la deuxième boucle, et du côté intracellulaire le site d'ubiquitination (Ub) au niveau de la Lysine 270 (K270). Modifié de (Moeller et al., 2011).

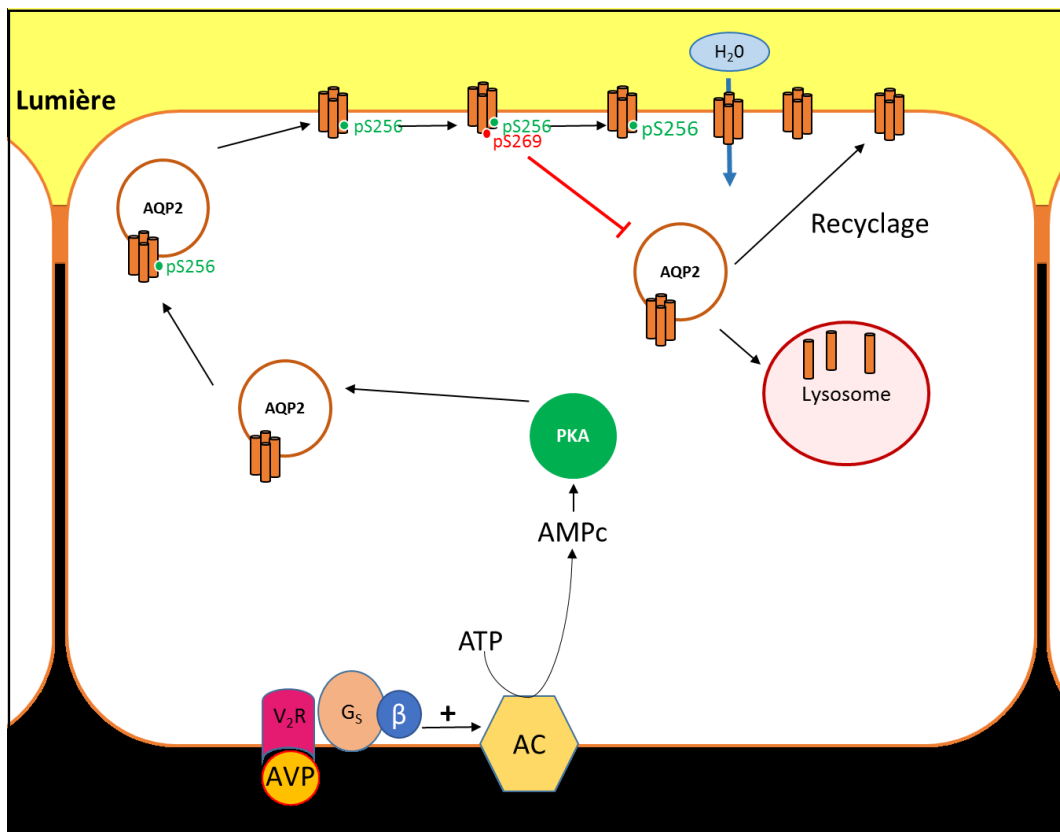


Figure 12. Régulation de l'AQP2 par phosphorylation induite par l'AVP. Une fois l'AVP liée à son récepteur V₂R, une cascade de signalisation est déclenchée via l'augmentation de la production de l'AMPc qui active le PKA. Ce dernier entraîne la phosphorylation de la sérine 256 de l'AQP2, qui permet son adressage à la membrane via la machinerie de l'exocytose. Par la suite la phosphorylation de l'AQP2 sur la sérine 269 empêchera, d'une part, son interaction avec l'actine et avec la machinerie d'endocytose et donc augmente l'accumulation de l'AQP2 au niveau de la membrane apicale des cellules. D'autre part, cette phosphorylation empêchera la dégradation de l'AQP2.

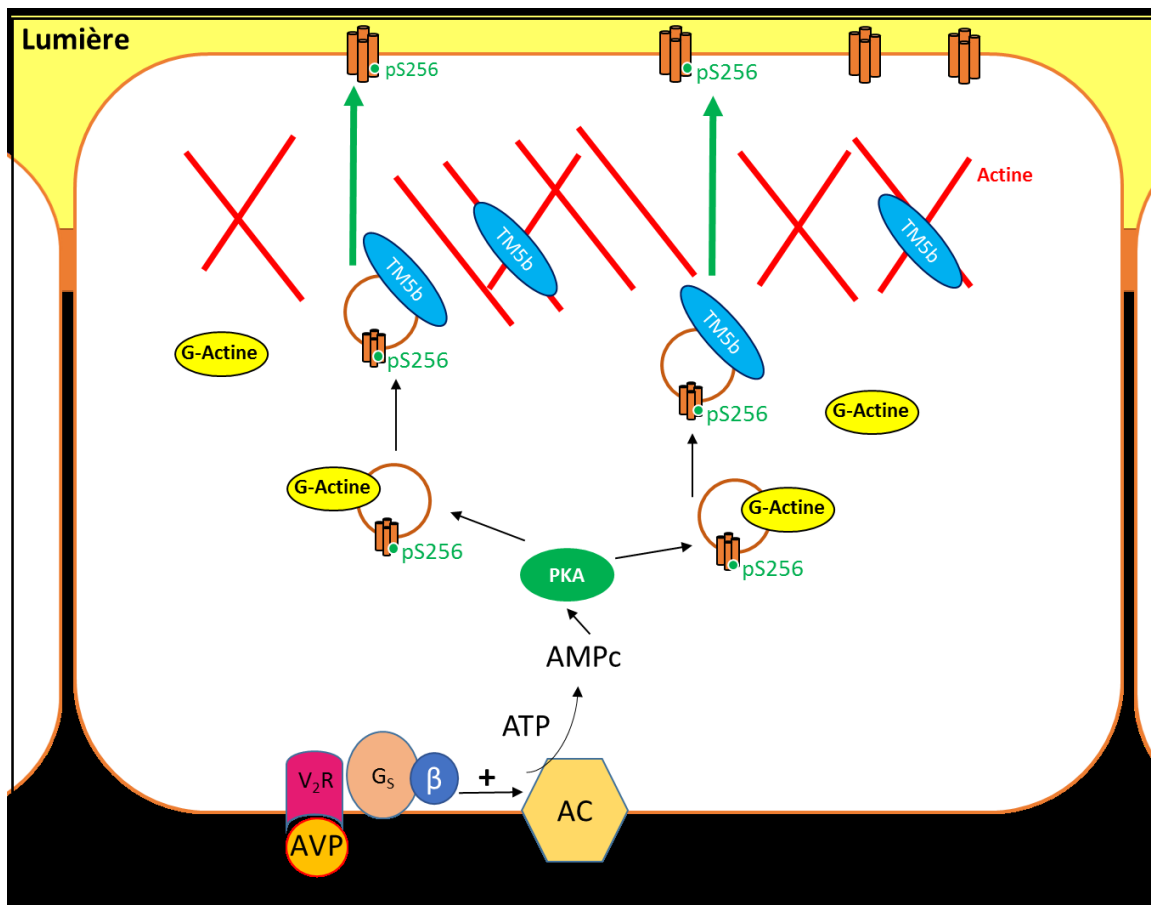


Figure 13. Mécanisme de la translocation de l'AQP2 du cytoplasme vers la membrane apicale de la cellule. L'augmentation de la production de l'AMPc dans la cellule suite à la liaison de l'AVP à son récepteur V2R, entraîne l'activation de la PKA. Ce dernier phosphoryle l'AQP2 au niveau de la sérine 256, ce qui la dissocie de l'actine G. L'AQP2 se lie alors à la TM5b et la dissocie des filaments d'actine ce qui les déstabilise. Ce dernier effet facilite le passage à la membrane de l'AQP2.

4. L'apeline

4.1. Historique et découverte de l'apeline :

L'apeline est un peptide bioactif isolé à partir d'extraits d'estomacs de bovins. Ce peptide a été découvert lors de recherches menées par Tatemoto et son équipe (Tatemoto et al., 1998). Ces travaux ont été effectués dans le but d'identifier un ligand spécifique pour le récepteur membranaire APJ (*Putative receptor protein related to AT₁*), jusqu'alors considéré comme un récepteur orphelin membre de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ce dernier a été découvert cinq ans auparavant par clonage de son ADNc à partir d'une banque génomique humaine lors de la recherche d'homologues du récepteur à l'AVP dans le cerveau humain (Tatemoto et al., 1998). L'APJ est un récepteur de 380 acides aminés qui partage 31 % d'homologie de séquence protéique avec le récepteur de type 1 de l'angiotensine (AT₁), d'où son nom APJ pour protéine putative reliée au récepteur AT₁. Malgré cette homologie, l'APJ ne lie pas l'angiotensine. Il partage une homologie de structure avec le récepteur CXC des chimiokines (CXCR4) et il agit comme corécepteur du CD4 pour l'entrée du virus HIV-1 dans les cellules. Par la suite, le récepteur APJ a été cloné chez la souris puis chez le rat (De Mota et al., 2000; O'Carroll et al., 2000). L'équipe de Llorens-Cortes a montré, par la surexpression de l'APJ dans un ovaire du hamster, que ce récepteur ne se liait pas aux angiotensines I, III et IV. Durant la période pendant laquelle cette même équipe tentait l'observation directe de l'internalisation de ce récepteur à l'aide d'un fluorophore, c'est Tatemoto et son équipe qui réussirent les premiers à l'identifier en utilisant une lignée qui exprime le récepteur APJ et en mesurant son activation utilisant la mesure des variations de pH extracellulaire à l'aide d'un Cytosenseur. Ils ont découvert qu'un peptide présent dans l'estomac du bœuf stimulait le récepteur APJ. Après purification, séquençage et clonage des fractions peptidiques actives, ils ont pu isoler un peptide qu'ils ont nommé alors apeline, pour ligand endogène pour le récepteur APJ.

4.2. Structure, expression et caractéristiques fonctionnelles :

Le gène de l'apeline humaine est situé sur le chromosome X locus Xq25-q26.1 et comporte 2 exons séparés par un intron de 6kb. La transcription de ce gène donne une protéine de 77 acides aminés, la proapeline. Celle-ci a été isolée dans différentes espèces dont l'homme, la souris, le rat et le bœuf. Pour ces quatre espèces, il existe une homologie de séquence parfaite dans les 17 derniers acides aminés carboxy terminaux correspondant à l'apeline-17 (figure 14). La proapeline donne naissance à plusieurs formes d'apeline d'expression différentielle selon le tissu et la localisation (figure 15). Selon la longueur du peptide, plusieurs formes d'apeline ont été identifiés. La forme pyroglutamyl de l'apeline-13 (pE13F) et l'apeline-17 (KF17) sont observées dans le cerveau et le plasma de rat, alors que l'apeline-36 est retrouvée dans la glande mammaire, le testicule et l'utérus. Les fragments les plus actifs du propeptide sont l'apeline pE13F ainsi que KF17 alors que les autres fragments de clivage R10F et G5 sont plus court et considérés inactifs (Reaux et al., 2001; El Messari et al., 2004; Llorens-Cortes et Beaudet, 2005).

Les ARN messagers de l'apeline et son récepteur APJ sont abondamment exprimés dans le cerveau du rat et de l'homme suggérant leur rôle important dans cet organe. Ils sont également présents dans différents tissus comme le rein, le poumon, le tissu adipeux, le cœur et les glandes mammaires durant la grossesse et l'allaitement (tableau 1). Cette expression ubiquitaire confère à l'apeline et son récepteur plusieurs fonctions dont la régulation de la réponse immune, une action inotrope positive dans le cœur et la régulation de l'homéostasie des fluides.

Homme	M N L R R C V Q A L L L L W L C L S A V C G G P L L Q T S D	30
Boeuf	M N L R L C V Q A L L L L W L S L T A V C G G S L M P L P D	30
Rat	M N L S F C V Q A L L L L W L S L T A V C G V P L M L P P D	30
Souris	M N L R L C V Q A L L L L W L S L T A V C G V P L M L P P D	30
Homme	G K E M E E G T I R Y L V Q P R G P R S G P G P W Q G G R R	60
Boeuf	G N G L E D G N V R H L V Q P R G S R N G P G P W Q G G R R	60
Rat	G K G L E E G N M R Y L V K P R T S R T G P G A W Q G G R R	60
Souris	G T G L E E G S M R Y L V K P R T S R T G P G A W Q G G R R	60
Homme	K F R R Q R P R L S H K G P M P F	77
Boeuf	K F R R Q R P R L S H K G P M P F	77
Rat	K F R R Q R P R L S H K G P M P F	77
Souris	K F R R Q R P R L S H K G P M P F	77
Apéline 17 (K17F)		
pE R P R L S H K G P M P F		
Forme pyroglutamyl de l'apéline 13 (pE13F)		

Figure 14. Séquence de la proapeline et les homologies de séquences entre l'homme, le bœuf, le rat et la souris. La proapeline est un peptide de 77 acides aminés. En rouge sont montrés les acides aminés communs entre les quatre espèces et correspondant à l'apeline-17 (17 acides aminés). Modifié de (Llorens-Cortes et Beaudet, 2005)

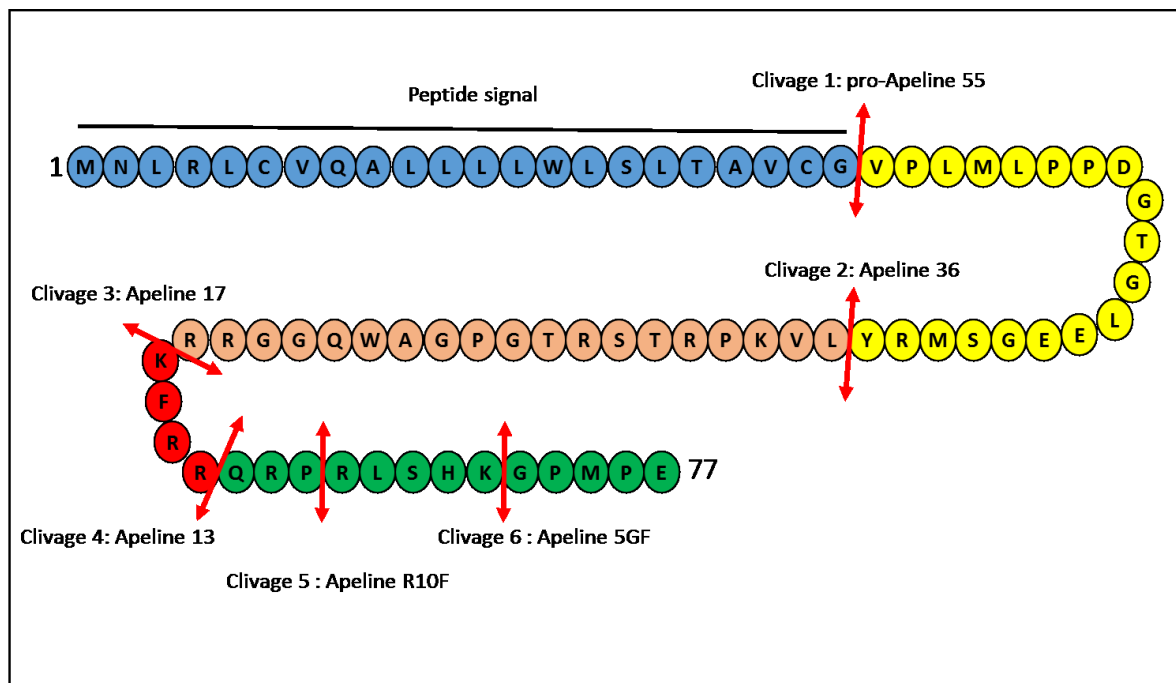


Figure 15. Représentation schématique de la composition de l'apeline et ses différentes formes. Chaque clivage donne naissance à une forme différente de l'apeline en termes de composition en acides aminés et de l'effet biologique en conséquence.

	APJ			Apeline		
	Rat	Souris	Humain	Rat	Souris	Humain
Cerveau	++	+	+++	+	+++	++
Cervelet	+		+	+		+
Hypophyse	+		+	+		++
Moelle épinière	+++	++	+	++		++
Glande surrénale	+			+		
Thyroïde	++					
Rate	-	+	+++	-	+	
Thymus		+	+		-	
Cœur	++	+++	+	++	++	+
Les cellules endothéliales	++					
Poumon	+++	++	++	+++	++	+
Estomac	+		+	+		-
Intestin grêle	+		++	+		-
Gros intestin	+		++	+		
Foie	+	+		-	-	-
Pancréas	-		+	-		+
Rein	+	+	+	+	+	+
Testicule	+	+	+	+	++	+
Prostate			+			+
Ovaire	+	+	+	+	+	
Utérus	+	+	+	+	-	-
Placenta	++		++			+++
Glande mammaire	+			++		
Muscle squelettique	++	++	+	+	+	-
Tissu adipeux	++			+		

Tableau 1. Distribution de l'apeline et son récepteur APJ dans différents tissus et organes chez l'homme, la souris et le rat. Modifié de (Kleinz et Davenport, 2005)

4.2.1. Expression de l'apeline et son récepteur dans le cerveau

Il a été montré par immunohistochimie que l'apeline est exprimée au niveau de l'hypothalamus, plus précisément dans les régions impliquées dans le contrôle neuroendocrinien de la dyspepsie et dans les zones de régulation de la pression artérielle. L'apeline est observée dans le noyau ambigu, le noyau arqué et le noyau réticulé latéral. De plus, des études de double marquage ont montré qu'elle est observée dans les neurones magnocellulaires des noyaux paraventriculaires hypothalamiques et dans les prolongements neuronaux au niveau de l'hypophyse postérieure au même titre que la vasopressine et l'ocytocine (figure 16). Le récepteur APJ est également exprimé dans les noyaux hypothalamiques riches en apeline, comme le PVN (*paraventricular nucleus*), le SON (*supraoptic nucleus*) et le noyau arqué, ainsi qu'au niveau de la glande pinéale et les lobes antérieurs et intermédiaires de l'hypophyse. Des études d'immunocytochimie et d'hybridation in situ, ont montré que l'ARNm et la protéine de l'APJ ainsi que les récepteurs de V1R et V2R de l'AVP sont synthétisés par les neurones magnocellulaires vasopressinergiques responsables de la production et la sécrétion de l'AVP.

4.2.2. Expression de l'apeline et son récepteur dans le rein

Plusieurs études s'accordent sur le fait que l'apeline ainsi que son récepteur APJ sont présents, à des niveaux variables, dans le rein du rat et de l'homme. L'équipe de Liorens-Cortes a montré que l'ARNm de l'APJ est présent dans les structures tubulaires et vasculaires du rein de rat (Hus-Citharel et al., 2014). L'expression la plus élevée a été observée au niveau des glomérules, dans les artérioles glomérulaires et dans la médullaire externe. Dans les tubes collecteurs, cette même équipe a montré que l'APJ est exprimé selon un gradient croissant allant du cortex vers la médullaire (figure 17). La présence de l'ARNm de l'apeline au niveau des cellules du parenchyme rénal n'a pas été démontrée de façon formelle, suggérant que l'apeline provient d'un autre organe pour activer localement son récepteur APJ.

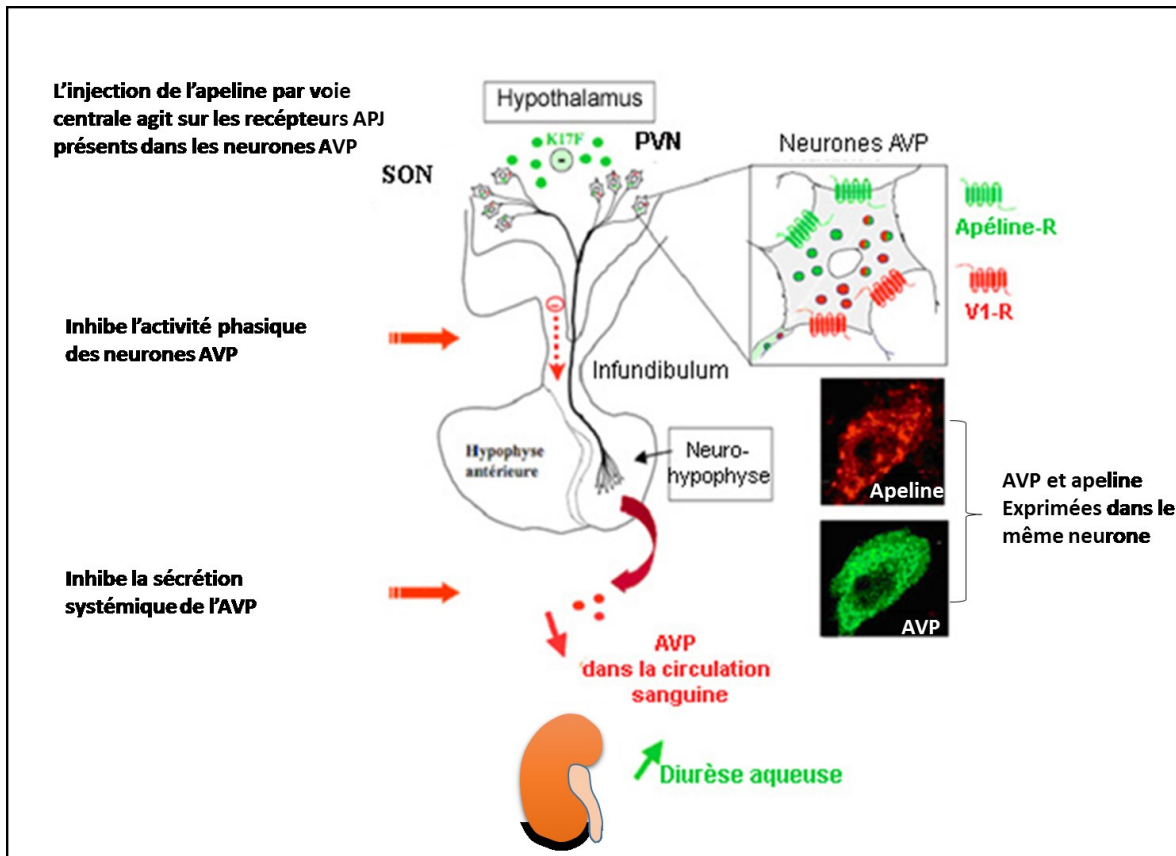


Figure 16. Expression de l'apeline KF17 comparée à celle de l'AVP dans l'hypothalamus ainsi que son action centrale. L'injection de l'apeline par voie centrale chez des rates lactantes (AVP+++), entraîne une baisse de la sécrétion de l'AVP dans la circulation sanguine et entraîne donc une diurèse aqueuse avec baisse de l'osmolarité des urines. L'encadré montre un corps cellulaire d'un neurone magnocellulaire qui exprime les deux récepteurs APJ et V₂R. Les deux microphotographies montrent l'expression de l'apeline (vert) et de l'AVP (rouge) dans le même neurone magnocellulaire. SON : *supraoptic nucleus*. PVN : *paraventricular nucleus*. Modifié de (Llorens-Cortes et Beaudet, 2005)

4.3. Signalisation induite par le récepteur APJ :

Ce récepteur peut se lier avec plusieurs isoformes de l'apeline dont l'apeline-36, 17 et 13. Les études effectuées sur l'ovaire du hamster, surexprimant l'APJ humain, ont montré que l'apeline-13 a une affinité de liaison plus grande pour l'APJ par rapport à l'apeline-36 (Hosoya et al., 2000).

La signalisation de l'apeline par l'intermédiaire de son récepteur peut activer plusieurs voies de signalisation dont les cibles finales sont souvent des facteurs de transcription (figure 18). Il est clair que ces voies de signalisation sont intriquées, ce qui complique la compréhension exacte des voies et des facteurs de transcription par lesquels les actions connues de l'apeline sont effectuées. D'autre part il est bien établi que l'activation de l'APJ par l'apeline entraîne sa liaison avec plusieurs types de protéines G selon les espèces. Par exemple, chez l'humain l'APJ s'associe à la protéine $G\alpha_{i2}$ pour phosphoryler ERK1/2 (Bai et al, 2008), alors que chez la souris son association est possible avec $G\alpha_{i1}$ et

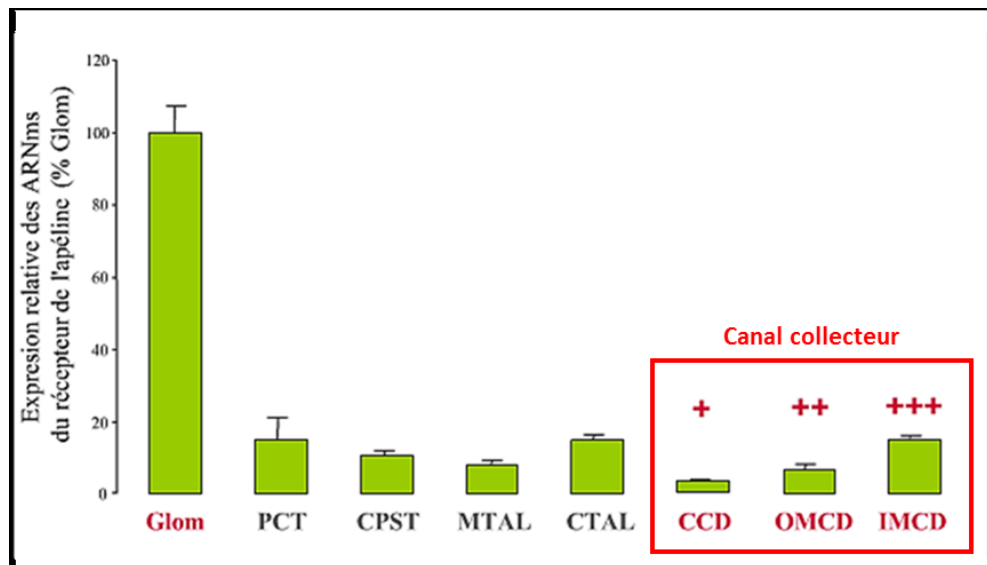


Figure 17. Expression de l'ARNm de l'APJ le long du néphron. L'APJ est exprimé dans le canal collecteur selon un gradient croissant allant de la corticale vers la médullaire interne. CCD : canal collecteur cortical. OMCD : canal collecteur de la médullaire externe. IMCD : portion du canal collecteur dans la médullaire interne. Modifié de (Hus-Citharel et al., 2008).

$G\alpha_{i2}$ ce qui entraîne l'inhibition de l'adényl cyclase et la phosphorylation de ERK1/2 (Masri et al., 2006). L'apeline peut également activer la voie PI3K/Akt via son récepteur APJ toujours par l'intermédiaire des petites protéines $G\alpha_{i1}$ et $G\alpha_{i2}$. Il s'agit ici d'un effet pro prolifératif et antiapoptotique de l'apeline. Ces fonctions sont connues dans les cellules musculaires lisses vasculaires chez l'homme et chez le rat (Cui et al., 2010; Liu et al., 2010). De façon intéressante les deux voies ERK1/2 et PI3K/Akt peuvent se croiser sur la même cible notamment dans les cellules HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). En effet l'apeline favorise la prolifération de ces cellules via la phosphorylation de la protéine kinase ribosomale p70S6K, d'une part par ERK1/2 et d'autre part par mTOR, une kinase elle-même activée par la voie PI3K/Akt (O'Carroll et al., 2013).

La liaison de l'APJ avec la protéine $G\alpha_{i0}$ entraîne quant à elle une baisse de la production d'AMPc et de ce fait, une diminution de la phosphorylation du PKA. Cette dernière voie et bien connue pour jouer un rôle important dans la régulation de l'expression et de la localisation subcellulaire de l'AQP2 par l'AVP comme expliqué plus haut.

4.4. Fonctions connues de l'apeline :

4.4.1. Effet sur le système cardiovasculaire :

Il a été montré que l'injection par voie intraveineuse de l'apeline entraîne une diminution de la pression artérielle et une augmentation de la force de contractilité du myocarde par un effet inotrope positif (Szokodi et al., 2002). L'effet sur la tension artérielle résulte d'une action anti angiotensine II, car des études ont montré que la perfusion d'angiotensine II entraîne une élévation de la pression artérielle plus importante chez les souris APJ $^{-/-}$ par rapport aux souris sauvages (Hus-Citharel et al., 2008). Une étude récente a démontré que cet effet résulte, suite à l'action de l'apeline, en la liaison du récepteur APJ avec le récepteur AT1, le séquestrant et empêchant ainsi sa liaison avec l'angiotensine II (Siddiquee et al., 2013). L'apeline entraîne également une vasodilatation artérielle et veineuse impliquant le monoxyde d'azote (NO) produit par les cellules endothéliales (figure 19).

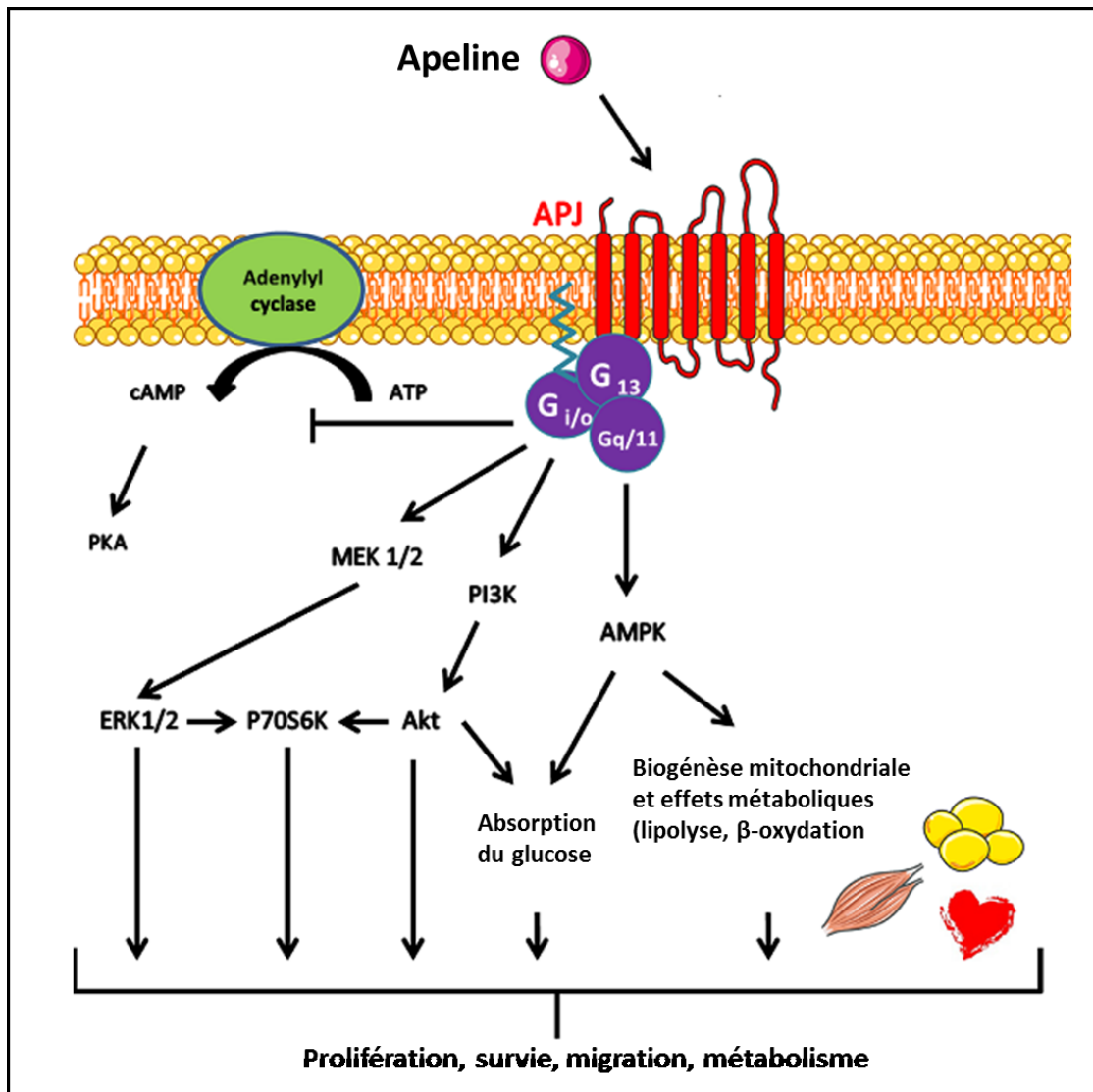


Figure 18. Voies de signalisation pouvant être moduler par le récepteur APJ. Une fois l'apeline se lie au récepteur APJ, plusieurs voies de signalisation peuvent être activées dont les voies PI3/Akt et MEK/ERK. L'activation de l'APJ entraîne aussi une inhibition de la formation de l'AMPc. Modifié de (Chaves-Almagro et al., 2015)

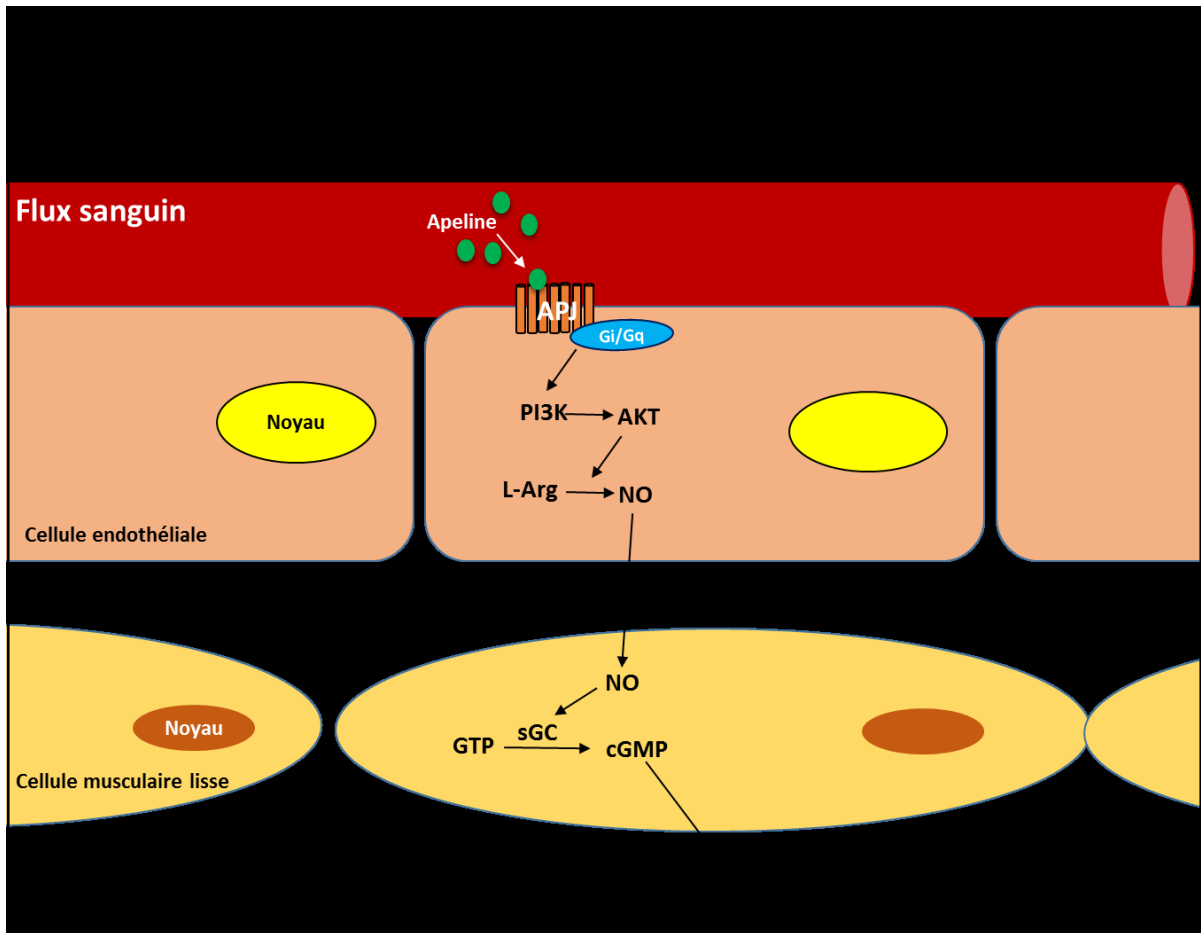


Figure 19. Action de l'apeline au niveau des cellules endothéliales. La liaison de l'apeline à l'APJ entraîne l'activation de la voie PI3/AKT qui augmente la production du NO (*Nitric Oxide*). Le passage de ce dernier dans les cellules musculaires lisses favorise la production du cGMP (*Cyclic Guanosine Monophosphate*) à partir du GTP (*Guanosine triphosphate*). Le cGMP est impliqué dans la relaxation des fibres musculaires lisses.

L'effet inotrope positif est dû à l'activation de la phospholipase C (PLC) puis la protéine kinase C (PKC) qui va activer l'échangeur Na^+/H^+ . Cette dernière active à son tour l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ qui permettra l'augmentation de l'entrée du Ca^{2+} en intracellulaire. Ce calcium va faciliter la phosphorylation des chaînes lourdes de myosine qui provoquent la contraction des cellules musculaires lisses des vaisseaux du myocarde (Hashimoto et al., 2006).

L'équipe de Llorens-Cortès a montré que l'apeline a un effet sur la paroi des vaisseaux sanguin pré et post glomérulaires. La même équipe a montré que le récepteur APJ est fortement exprimé au niveau du réseau vasculaire du glomérule (Hus-Citharel et al., 2008).

4.4.2. Effet sur la régulation de l'équilibre hydrique

4.4.2.1. Action centrale :

L'injection de l'apeline-17 dans le troisième ventricule chez des rates lactantes entraîne une inhibition de l'activité électrique phasique des neurones sécrétant l'AVP, ce qui réduit le taux plasmatique de l'AVP et entraîne une diurèse aqueuse (Llorens-Cortès et Beaudet, 2005). Il est à noter que ce modèle animal a été utilisé dans l'étude de l'équilibre hydrique car il est caractérisé par une synthèse et une sécrétion accrues d'AVP dans le but de préserver l'eau pour une production maximale de lait. Dans cette étude, il a été montré que la privation en eau augmente le relargage de l'AVP dans la circulation systémique et engendre une accumulation de l'apeline dans les neurones sécréteurs de l'AVP et une baisse dans le plasma. Ce constat indique que l'apeline et l'AVP sont régulés de façon opposée pour le maintien de l'homéostasie hydrique par le système nerveux central.

4.4.2.2. Action périphérique :

En plus de son action centrale dans la régulation de l'homéostasie hydrique, l'apeline pourrait avoir un effet direct périphérique particulièrement au niveau rénal. En effet, des études utilisant des souris $\text{APJ}^-/-$ ont montré que la privation en eau réduit le volume urinaire et augmente l'osmolarité chez les souris sauvages mais pas chez les souris $\text{APJ}^-/-$,

même si la concentration de l'AVP augmente de façon comparable chez les deux groupes de souris. Par ailleurs, il a été montré que la desmopressine, un agoniste du récepteur V2, augmente l'osmolarité des urines chez les souris APJ^{-/-} mais pas chez les souris sauvages. Ceci indique qu'il y a une altération des voies de signalisations sous-jacentes au V2R dans les souris APJ^{-/-} (Roberts et al., 2009). Une étude plus récente a montré que l'injection de l'apeline-17 à des souris lactantes entraîne une augmentation de la diurèse avec baisse de l'osmolarité urinaire (Hus-Citharel et al., 2008). Par des techniques d'immunohistochimie, ces auteurs ont également montré une diminution de l'insertion de l'AQP2 au niveau de la membrane apicale des cellules principales du canal collecteur (Hus-Citharel et al., 2014). Cette diminution était plus marquée au niveau de la partie intra médullaire interne du canal collecteur par rapport à sa portion corticale. Cet aspect était aussi en corrélation avec le profil d'expression de l'APJ au niveau du rein. Le mécanisme exact de ce dernier effet n'est pas encore démontré.

PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS :

L'expression ubiquitaire de l'apeline et de son récepteur indique que le système apelinergique pourrait jouer un rôle physiologique important dans différents tissus et organes. Plusieurs études ont montré l'action anti-vasopressinergique de l'apeline au niveau central. Des études récentes suggèrent que l'apeline, en plus de son effet central, aurait une action anti-vasopressinergique périphérique dans le maintien de l'homéostasie hydrique, mais les mécanismes moléculaires de cet effet périphérique restent encore mal connus. Lors de la régulation de l'équilibre hydrique au niveau rénal, la principale molécule activée par la vasopressine est l'aquaporine2 (AQP2). Nous postulons donc que le rôle anti-vasopressinergique de l'apeline au niveau rénal pourrait se traduire par une modulation de la fonction et/ou de l'expression de l'AQP2.

Le tubule collecteur du néphron est la cible d'action de la vasopressine. Nous avons donc utilisé des cellules issues du tubule collecteur de néphron de souris, les mpkCCD_{c14}, pour étudier les mécanismes moléculaires de l'effet anti-vasopressinergique de l'apeline au niveau rénal.

Dans mon travail de maîtrise, je me suis fixé les objectifs suivants :

- A. Montrer l'expression du récepteur de l'apeline au niveau des mpkCCD_{c14} pour valider mon modèle expérimental.
- B. Étudier l'effet de l'apeline sur l'expression de l'AQP2.
- C. Définir l'impact de l'apeline sur la localisation membranaire de l'AQP2.

MATÉRIELS ET MÉTHODES :

1. Culture cellulaire

Les cellules murines immortalisées du tubule collecteur cortical de rein (mpkCCD_{c14}) nous ont été données par le professeur Vandewalle, qui les a caractérisé (Duong Van Huyen et al., 1998). Ces cellules ont été cultivées dans un milieu de culture DMEM F12 (*Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F-12* (v/v), Wisent, ON) supplémenté avec 5 µg/ml de transferrine, 20 mM de D-glucose, 2% de sérum fœtal bovin (FBS), 20 mM de Hepes, 1% de pénicilline/streptomycine, 5 µg/ml d'insuline, 50 nM de dexaméthasone, 60 nM de sodium sélénate, 1 nM de triiodothyronine, et 10 ng/ml de facteur de croissance épidermique (EGF). Les cellules ont étéensemencées à une densité de 80 000 cellules/cm² dans des Pétris de 100 mm, cultivées à 37°C et 5% de CO₂ jusqu'à 80% de confluence, et ensuite transférées sur des filtres semi-perméables de 4.5 cm² contenant des pores de 0.4 µm (Greiner-Bio-One, Germany). Quand la résistance trans-épithéliale atteint 4500 Ω/cm² (4-5 jours après l'ensemencement), les cellules ont été traitées avec 10 nM de dDAVP (1-desamino-8-d-arginine vasopressine, Sigma-Aldrich, Oakville, ON) en présence ou en absence de 200 nM d'apeline 13 selon les expériences. Tous les traitements ont été ajoutés au compartiment basolatéral et le milieu de culture a été changé tous les jours.

2. Extraction protéique et immunobuvardage

Après chaque traitement, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS (*Phosphate-buffered saline*) froid avant d'être lysées pendant 25 min dans 300 µl de solution de lyse froide (20 mM de tris HCl, pH 7.4, 5 mM d'EDTA, 40 mM de bêta-glycérophosphate, 30 mM de NaF, et 1% de triton X-100) supplémentée avec 200 mM de sodium orthovanadate et d'inhibiteurs protéiques completeTM EDTA-free (Roche Diagnostics, Laval, QC). Le dosage protéique a été réalisé suivant la procédure BCA (*BiCinchoninic acid Assay*), un dosage colorimétrique des protéines. Vingt-cinq µg de protéines a été migré sur un gel SDS-PAGE de 12 % et transféré sur une membrane de PVDF (Polyvinylidène difluoride; Perkin Elmer, Woodbridge, ON). Les membranes ont été colorées avec du rouge de

Ponceau 0,2% (Sigma-Aldrich, Oakville, ON), afin de confirmer que la quantité de protéines entre les puits était uniforme.

Les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués pendant 2 h, à température pièce (TP), dans du TBST (20 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween-20) contenant 6 % de lait écrémé. Pour la détection de l'AQP2 phosphorylée au niveau de la sérine 269, les membranes ont été incubées dans du TBST avec 5 % de BSA. L'hybridation des membranes a été faite à 4°C pendant la nuit avec les anticorps primaires suivants : anti-AQP2 (monoclonal de lapin, 1/2000, 110-74682, Novus Biologicals, CA); anti-AQP2-pS269 (polyclonal de lapin, 1/1000, p112-269, PhosphoSolutions, Aurora, CO); anti-actine (monoclonal de souris, 1/10000, MAB1501, Millipore, CA); anti- α Na⁺/K⁺-ATPase (monoclonal de souris, sc-21712, 1\1000, Santa Cruz, CA); anti- β -lamine (polyclonal de chèvre, 1/1000, sc-6216, Santa Cruz, CA); anti-APJ (polyclonal de lapin, 1\10000, Neuromics, RA14111, Edina, MN) et anti-GAPDH (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, polyclonal de lapin, 1\1000, ab9485, Abcam, Cambridge, MA). Les membranes ont été lavées 3 fois (10 min chaque) dans du TBST et hybridées (1h à TP avec agitation) avec 1/5000 d'anticorps secondaire HRP-conjugué approprié : anti-souris (NA931V, Santa Cruz, CA); anti-lapin (NA934V, Amersham, CA); ou anti-chèvre (sc 2352, Santa Cruz, CA). Après 5 lavages dans du TBST, les protéines ont été détectées en utilisant la trousse *Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus* (Perkin Elmer, Woodbridge, ON) et la révélation a été réalisée par radiographie sur des films Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare Life Sciences, Mississauga, ON). L'analyse densitométrique des protéines a été effectuée en utilisant le logiciel Image J (Abramoff, 2004).

Protocole de décapage des anticorps : les membranes PVDF ont été incubées dans une solution de décapage (62.5 mM de Tris-HCl, pH 6.8; 2 % de SDS; et 0.8 % de β -mercaptoéthanol) à 54°C pendant 25 min, lavées pendant 1 h dans de l'eau, et ensuite équilibrées dans du TBST pendant 15 min. Pour s'assurer que les anticorps ont été enlevés des protéines, les membranes ont été incubées dans une solution de blocage pendant 1h, hybridées avec l'anticorps secondaire approprié, et les protéines ont été révélées avec un film ECL.

3. Déglycosylation des protéines

Après le traitement des cellules et l'extraction des protéines, les protéines ont été déglycosylées suivant les procédures recommandées par la compagnie. Par la suite, 25 µg de protéines ont été pré-incubées à 37°C pendant une heure dans une solution de dénaturation des glycoprotéines (tampon de réaction G7 avec 10 % de Nonidet P-40), en présence ou absence de 100 U de Peptide-N-glycosidase F (PNGase F, P0704S, NEB, Montréal, QC). Par la suite, les protéines ont été migrées dans un gel SDS-PAGE de 12 % (consultez la section extraction protéique et immunobuvardage pour les détails).

4. Extraction d'ARN, transcription inverse et quantification

L'ARN total a été extrait avec du TRIzol (Life Technologies, Burlington, ON) selon les recommandations de la compagnie. Afin d'éliminer la contamination potentielle par l'ADN, l'ARN total a été traité avec de la DNase (Promega, Madison, WI) pendant une heure à 37°C. L'ARN a été retranscrit en ADNc selon les recommandations de la compagnie (Quantitect, Qiagen, CA). Ce dernier a été ensuite amplifié en utilisant des amorces spécifiques pour l'AQP2 de souris *mAQP2* (sens 5'-ctggctgtcaatgctctccac-3' et antisens 5'-ttgtcactgcggcgctcatc-3') et le *mGAPDH* (sens 5'-tggtgccaaaagggtcatc-3' et antisens 5'-cttcacgatgccaaagttg-3'). La quantification PCR en temps réel a été effectuée en triplicata avec du Brilliant II SYBR Green QPCR master mix (Stratagene, Mississauga, Ontario) dans une machine MX3000P Real-Time (Stratagene, La Jolla, CA). Les niveaux d'expression des ARNm ont été calculés en « changement relatif » par rapport à la condition contrôle, normalisés avec l'expression du *mGAPDH*, et calculés avec le modèle mathématique de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

5. Fractionnement subcellulaire

Lorsque la résistance transépithéliale atteint 4500 Ω.cm², les cellules ont été traitées avec de l'AVP en présence ou en absence de l'apeline-13 selon les temps indiqués. Les cellules ont été lysées dans du tampon de lyse (10 mM d'HEPES, 10 mM de KCl, 0.1 mM d'EDTA, 1 mM de DTT, et 0.4 % de nonidet P-40) pendant 20 min à 4°C, et ensuite centrifugées à 10 000 × g pendant 10 min 4°C. Le culot 1 a été suspendu dans du tampon d'extraction

nucléaire (20 mM d'HEPES, 400 mM de NaCl, 1mM d'EDTA, et 1 mM de DTT) et centrifugés à 24 000 x g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant contenant la fraction cytoplasmique, obtenu suite à la première centrifugation de 10 000 x g, a été centrifugé pendant une heure à 100 000 x g à 4°C afin d'obtenir une fraction membranaire (culot 2) et une fraction cytosolique (surnageant) (Thomas et al., 2011). Le culot 2 a été resuspendu dans le tampon de lyse. Pour chaque condition, trois monocouches de cellules (de trois filtres identiques) ont été combinées dans le but d'obtenir des quantités de protéines suffisantes pour l'analyse en immunobuvardage.

6. Microscopie confocale à fluorescence

Le milieu de culture a tout d'abord été enlevé des inserts et des puits des plaques de culture cellulaire. Par la suite, les cellules ont été fixées avec une solution de 4 % de formaldéhyde pendant 20 min à 4°C et perméabilisées avec de PBST (*Phosphate Buffered Saline*, *Triton X-100* 0.5 %) pendant 5 min à TP. Les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués en utilisant 5 % de PBS-BSA pendant 60 min à TP. Les monocouches cellulaires ont été incubées avec l'anticorps primaire polyclonal de lapin anti-AQP2 (1/500) ou anti-AQP2-pS269 (1/600). Les deux anticorps ont été incubés, pendant la nuit à 4°C, en présence de l'anticorps primaire monoclonal de souris anti-occludin (1/500, sc-271842, Santa Cruz, CA). Les échantillons ont ensuite été incubés avec les anticorps secondaires de chèvre contre le lapin Alexa-Fluor568 et de lapin contre la souris Alexa-Fluor488 (Invitrogen, Burlington, ON) pendant 60 min à TP. Les noyaux ont été colorés pendant 2 min à TP avec 10 ng/ml de 4'6-Diamidino-2-phénylindol dihydrochloride (DAPI) dans du PBS (pH 7.4). Après un lavage, les filtres ont été détachés de l'insert avec un scalpel et ensuite installés sur des lames de microscopie avec du milieu de montage pour la fluorescence. Les spécimens ont été analysés dans les plans x-y et x-z avec un microscope confocal Olympus (IX-81) à balayage laser FV1000 (Olympus, Richmond Hill, Canada). Les intensités de fluorescence de l'AQP2 apicale et de l'AQP2-pS269 ont été mesurées avec le logiciel Metamorph 7.7 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA). Les mêmes réglages de microscope ont été utilisés pour chaque condition.

7. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM à partir d'expériences indépendantes. Chaque expérience a été réalisée sur des cellules ayant le même nombre de passages et toutes les expériences ont été effectuées au moins trois fois. Le nombre précis d'expériences effectuées est indiqué dans les légendes des figures. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel Prism (Graph Pad Software, San Diego , CA). Les données ont été considérées comme statistiquement significatives à $p < 0,05$. Le test t apparié de Student et l'ANOVA, avec le test des comparaisons multiples de Bonferroni, ont été utilisés pour analyser les données.

RÉSULTATS

1. Validation du model expérimental :

1.1. Mise en évidence de l'expression endogène de l'APJ dans les cellules du tubule collecteur de néphron de souris, les mpkCCD_{c14}

Plusieurs études ont montré que le récepteur APJ est exprimé au niveau de divers tissus comme le cerveau, le poumon ou le néphron, aussi bien dans sa partie glomérulaire qu'au niveau du système tubulaire (Kleinz et Davenport, 2005; Hus-Citharel et al., 2014). La lignée cellulaire mpkCCD_{c14} dérive du tubule collecteur cortical (TCC) de souris et possède les caractéristiques fonctionnelles essentielles de la cellule principale du TCC (Duong Van Huyen et al., 1998). Elle a été sélectionnée pour sa haute résistance transépithéliale ainsi que sa sensibilité à l'aldostérone et à la vasopressine. Bien que les mpkCCD soient largement utilisées pour étudier la régulation du transport hydrique et l'expression des AQP2 au niveau du tubule collecteur (Hasler et al., 2006; Wildman et al., 2009), aucune étude n'a montré que cette lignée cellulaire exprime les récepteurs APJ.

Afin de valider l'utilisation de notre modèle et d'évaluer l'effet anti-vasopressinergique que l'apeline pourrait exercer au niveau du tubule collecteur, nous avons dans un premier temps, vérifié l'expression endogène de l'APJ au niveau des cellules mpkCCD_{c14}. Pour cela nous avons réalisé des expériences d'immunobuvardage sur des extraits de monocouches de cellules mpkCCD_{c14} en présence de l'anticorps anti-APJ (Neuromics). Comme l'expression de l'APJ a été décrite au niveau du cerveau (Hosoya et al., 2000; O'Carroll et al., 2000), nous avons utilisé un broyat de cerveau de rat adulte comme contrôle positif. Nous avons utilisé les extraits protéiques de la lignée HEK-293 (*Human Embryonic Kidney 293*) comme contrôle négatif car plusieurs travaux ont démontré l'absence d'APJ dans ces cellules (Medhurst et al., 2003; Rao et al., 2004). Nos résultats de la figure 20 indiquent la présence d'une bande spécifique à environ 44 kDa correspondant à la forme non-glycosylée du récepteur APJ murin dans les extraits de cellules mpkCCD_{c14} ainsi que dans le cerveau de rat. On note également l'absence de bande dans les puits réservés aux protéines provenant des cellules HEK-293.

Nos expériences confirment donc les données rapportées dans la littérature et montrent de façon claire que l'APJ est constitutivement exprimé par les cellules mpkCCD_{c14}. De ce fait, notre modèle est valide pour étudier l'effet de l'apeline sur l'expression et la fonction des aquaporines.

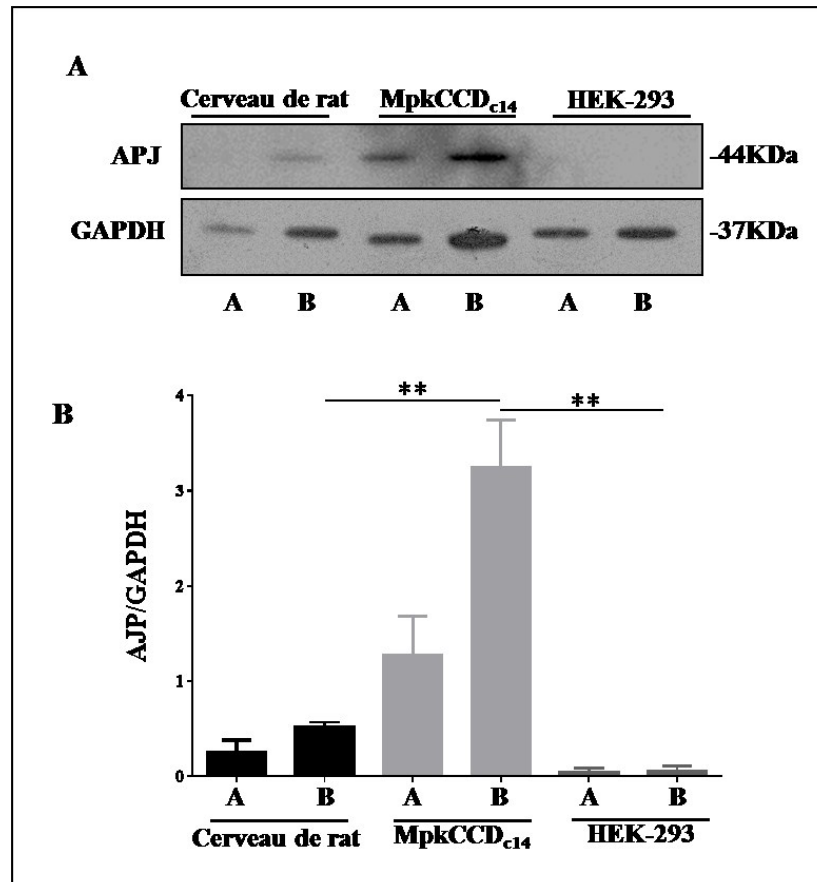


Figure 20. Expression du récepteur APJ dans les cellules mpkCCD_{c14} (A) immunobuvardage montrant la présence de l'APJ dans les mpkCCD_{c14} et dans le cerveau du rat. Les cellules HEK293, qui n'expriment pas l'APJ, ont été utilisées comme contrôle négatif. A et B montrent respectivement les quantités de protéines chargées dans le gel d'immunobuvardage, soit 5 µg et 10 µg. Le GAPDH a été utilisé comme contrôle du chargement. (B). Histogramme illustrant le résultat de l'analyse densitométrique de trois expériences faites séparément. Les résultats, comparés au cerveau du rat et aux cellules HEK-293, et dont le p est inférieur à 0,05 sont considérés comme statistiquement significatifs. La significativité statistique est déterminée par des astérisques comme suit : ** = p < 0.01.

1.2. Choix des filtres pour étudier l'expression des AQP2 dans les mpkccd_{c14}

Comme décrit précédemment, après avoir atteint une confluence d'environ 80%, les cellules mpkCCD_{c14} ont été transférées sur filtre. Ainsi, elles forment une monocouche polarisée ayant un pôle apical et un pôle basal. Deux types de filtres (polycarbonate ou polyester) sont à disposition et ont souvent été utilisés pour étudier la régulation du transport hydrominéral au niveau des cellules mpkCCD_{c14}. Les caractéristiques de ces deux types de filtres sont bien définies, les principales différences sont décrites dans le tableau 2. Étant donné que les deux types de filtres ont été utilisés dans plusieurs études pour des expériences similaires à celles qu'on a réalisé (Hasler et al., 2002; Yu et al., 2009; Li et al., 2011; Loo et al., 2013), nous avons donc effectué une série d'expériences pour déterminer lequel des deux filtres est le mieux adapté à notre étude. Pour ce faire, nous avons transféré des cellules (~ 80% de confluence), issues de la même boîte de pétrie sur des filtres en polycarbonate et des filtres en polyester. La culture des mpkCCD_{c14} a été suivie et les cellules ont été maintenues jusqu'à l'obtention d'une monocouche polarisée ayant une résistance de l'ordre de 4500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ comme décrit dans la section matériels et méthodes. Nos résultats de la figure 21 montrent que seules les cellules transférées sur filtre de polyester présentent une augmentation au niveau de l'expression de l'AQP2 suite au traitement par l'AVP. Ces résultats appuient les données de la littérature (Loo et al., 2013) et confirment que les filtres les plus adaptés pour l'étude de l'expression de l'AQP2 sont les filtres faits de polyester.

Caractéristiques	Filtre polycarbonate	Filtre polyester
Visibilité des cellules	Mauvaise	Bonne
Taille des pores (μm)	0,4	0,4
Nombre de pores	100 x 10 ⁶ pores/cm ²	2 x 10 ⁶ pores/cm ²

Tableau 2. Différences entre les filtres en polycarbonate et les filtres en polyester. Ces filtres sont couramment utilisés dans l'étude du transport de l'eau et des électrolytes dans les cellules mpkCCD_{c14}. Il y a 50 fois plus de pores par cm² dans les filtres en polycarbonate par rapport aux filtres faits de polyester.

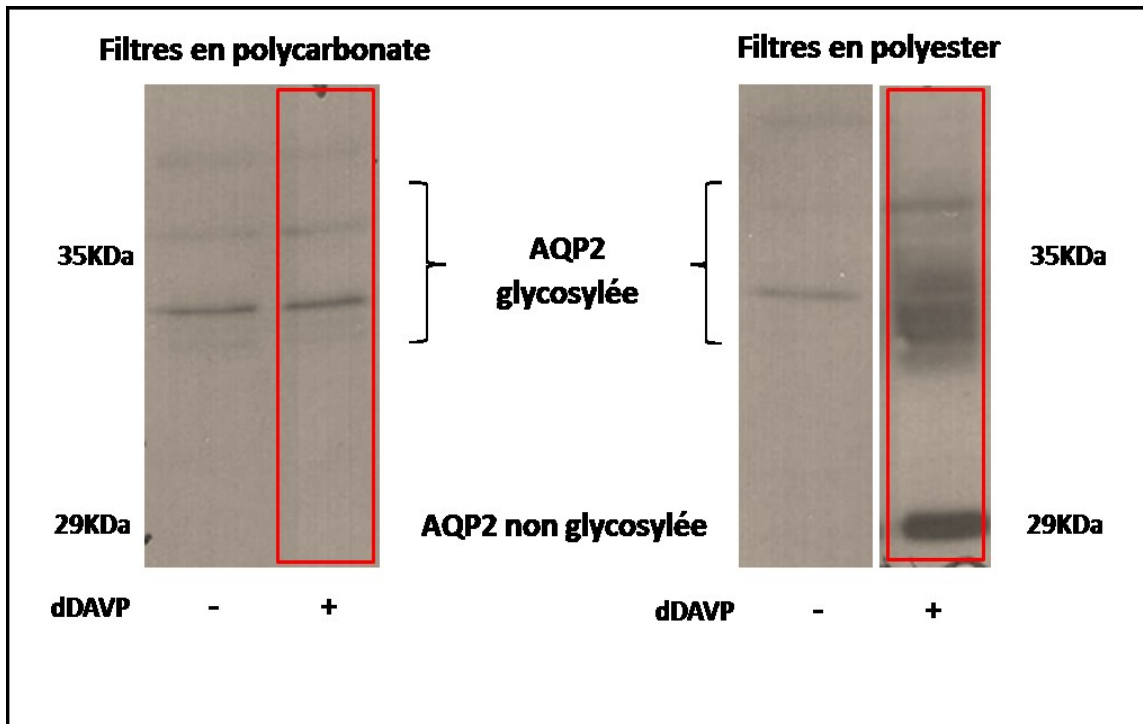


Figure 21. Comparaison entre l'expression de l'AQP2 par les cellules mpkCCD_{c14} en culture sur les filtres de polycarbonate et de polyester. Les cellules mpkCCD_{c14}, ayant atteints 80% de confluence sur Petri de plastique, ont été transférées soit sur un filtre de polycarbonate soit sur un filtre de polyester. Dans les deux conditions les cellules ont été soit laissées sans traitement soit traitées pendant 24 heures avec 10 nM de la dDAVP du côté basolateral. Après lyse des cellules, les extraits protéiques ont été migrés sur gel et transférés sur membrane de PVDF. Celles-ci ont été incubées avec les anticorps anti AQP2. La partie du gel qui comporte la région de détection de l'AQP2 est encadré en rouge. L'AQP2 est détecté seulement dans les cellules traitées avec la dDAVP et cultivées sur filtre de polyester. Ce gel est représentatif de trois expériences séparées.

2. Effet de l'apeline sur l'expression de l'ARNm des AQP2

Il est bien connu que l'action antidiurétique exercée par la vasopressine s'effectue en contrôlant l'expression et la translocation des AQP2. Cette régulation se fait selon deux différents mécanismes, un à long terme et l'autre à court terme.

Depuis une vingtaine d'années, différentes études ont montré que l'administration de la vasopressine diminue la diurèse des rats Brattleboro (rats présentant une inactivation spontanée du gène de la vasopressine). Ces observations ont été accompagnées d'une augmentation de l'expression de l'AQP2 au niveau des cellules principales des tubules collecteurs des rats Brattleboro (DiGiovanni et al., 1994; Hayashi et al., 1994; Yasui et al., 1997).

Des travaux de Hasler et ses collaborateurs, effectués sur les mpkCCD_{c14} ont montré que l'AQP2 est faiblement exprimée au niveau de ces cellules en conditions basales. Par contre, les cellules traitées à la vasopressine montrent une forte augmentation de l'expression de l'AQP2 suggérant un effet transcriptionnel de la vasopressine (Hasler et al., 2002; Hasler et al., 2006). Afin de vérifier l'action anti-vasopressinergique de l'apeline sur l'AQP2, nous avons tout d'abord étudié son effet sur la quantité totale d'ARNm de l'AQP2. Pour ce faire, des cellules stimulées ou non à la vasopressine ont été traitées pendant 8 h ou 24h par 200 nM d'apeline-13 du côté basolatéral. Les cellules non traitées sont utilisées comme contrôle négatif. Comme démontré dans plusieurs études (Hoffert et al., 2008; Kortenoeven et al., 2012; Trimpert et al., 2012), nos résultats confirment que la vasopressine stimule l'expression relative de l'ARNm de l'AQP2 (figure 22). Après 24h de traitement au dDAVP, nos cellules montrent une augmentation du messenger de l'AQP2 de $8,34 \pm 2,05$ fois. De manière intéressante, en présence continue de l'AVP, cet effet diminue de 65% et 80% lorsque les cellules sont traitées par l'apeline pendant 8h ou 24h respectivement, suggérant ainsi que ce peptide antagonise l'effet de l'AVP.

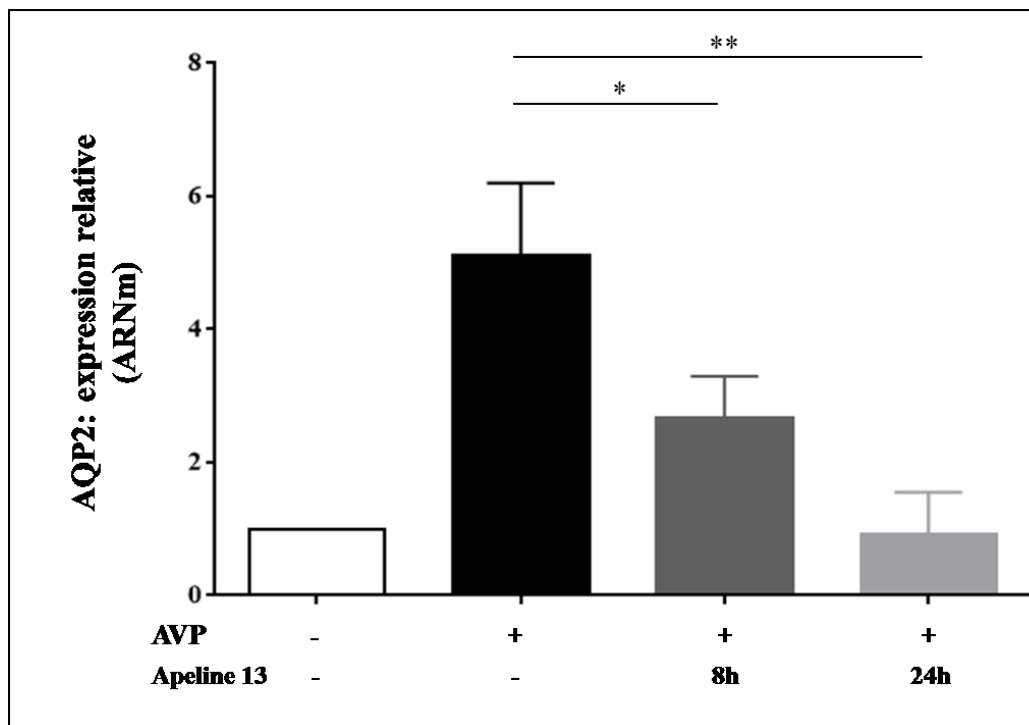


Figure 22. Effet de l'apeline-13 sur l'expression de l'ARNm de l'AQP2. L'extraction des ARNs et la transcription inverse ont été effectuées selon le protocole recommandé par le fabricant. L'amplification utilisant des sondes spécifiques pour l'AQP2 de souris a été faite par PCR quantitative en temps réel. Les quantités relatives ont été calculées selon la méthode de Pfaffl (Pfaffl, 2001), comparées au contrôle non traité et normalisées au gène de référence GAPDH de souris. Les barres correspondent aux SEM issus de 5 expériences indépendantes. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

3. Effet sur l'expression protéique totale de l'AQP2

Afin de vérifier l'effet de l'apeline sur l'expression protéique totale de l'AQP2, nous avons réalisé des expériences d'immunobuvardage sur les extractions protéiques des cellules mpkCCD_{c14} stimulées ou non au dDAVP et traitées pendant 8h ou 24h à l'apeline. En présence de dDAVP on détecte une bande à un poids moléculaire de 29 kDa et une multitude de bandes au tour de 35 kDa correspondant respectivement à l'AQP2 non glycosylée et l'AQP2 glycosylée (figure 23A). Les extraits de cellules non traitées ont été utilisés comme contrôle négatif et la β -actine a été utilisée comme contrôle interne des différentes conditions. Les bandes détectées dans les différentes conditions ont été normalisées par rapport aux extraits protéiques des cellules non traitées. Comme attendu, nos quantifications de l'intensité relative des bandes (figure 23B) montrent que le traitement au dDAVP augmente l'expression de l'AQP2 de façon très importante ($AQP2/\beta\text{-actine} = 122,07 \pm 2,78$, $n=5$). Cet effet est diminué significativement suite au traitement des cellules à l'apeline pendant 8h ou 24h. Ces résultats supportent les données de la littérature et suggèrent que l'apeline a un effet anti-vasopressinergique sur l'expression protéique de l'AQP2 totale.

4. Glycosylation de l'AQP2 et effet de l'apeline

Il est bien connu que la glycosylation est un des processus impliqués dans la maturation des protéines (Baumgarten et al., 1998; Hendriks et al., 2004). Dans le cas de l'AQP2, il a été rapporté qu'une N-glycosylation s'effectue au niveau de la deuxième boucle extracellulaire au site consensus N123-X-T125 (Bai et al., 1996). À l'aide d'une série d'expériences en immunobuvardage, ces auteurs ont montré que la taille de l'AQP2 glycosylée se situe au tour de 35kDa. Afin de vérifier si les bandes à haut poids moléculaires correspondent bien à la forme glycosylée de l'AQP2, nos extraits protéiques (traités et non traités) ont été incubés pendant 1h à 37°C dans un tampon contenant la N-glycosidase. Nos résultats de la figure 23C montrent que les bandes situées autour de 35kDa disparaissent sous l'effet de la N-glycosidase appuyant ainsi notre hypothèse.

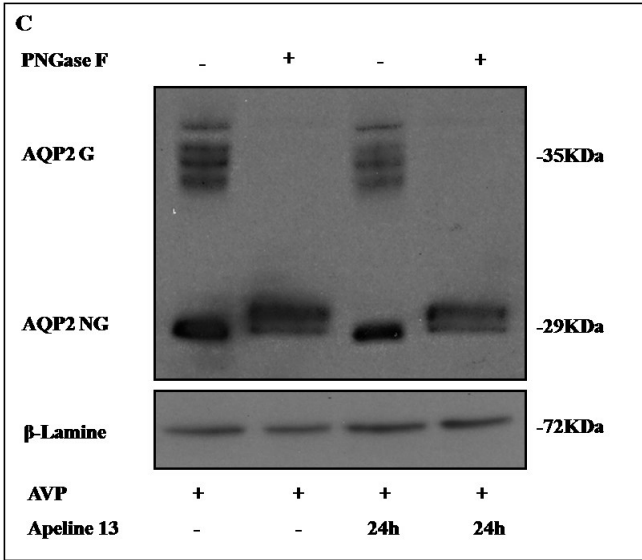
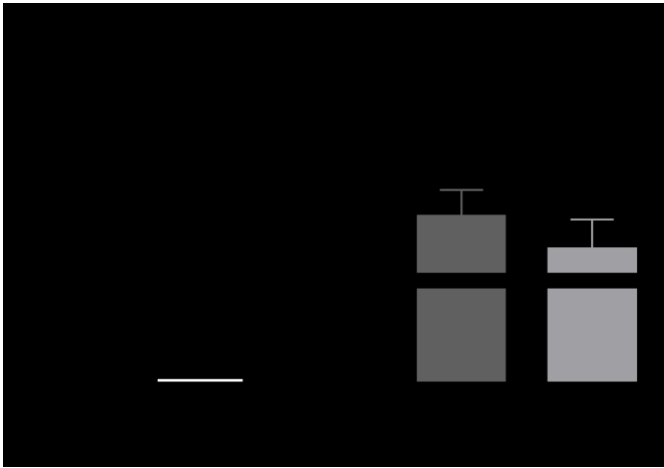
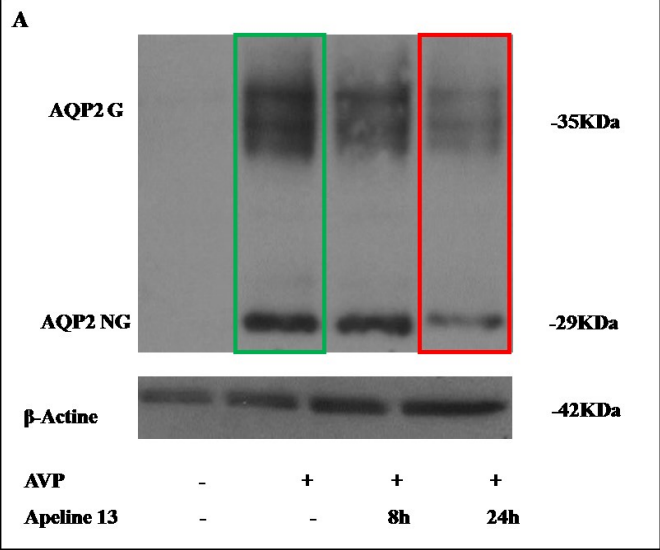


Figure 23. Effet de l'apeline-13 sur les niveaux protéiques de l'AQP2. **(A)** Immunobuvardage représentatif qui montre l'expression des formes non-glycosylée (AQP2-NG) et glycosylée (AQP2 G) de l'AQP2 dans les extraits protéiques issus des cellules mpkCCD_{c14} après un traitement par le dDAVP en absence (encadré vert) ou en présence de l'apeline13 pendant 8 h ou 24 h (encadré rouge). LA β -Actine a été détectée pour vérifier le chargement. **(B)** Analyse densitométrique de l'expression de l'AQP2 résultant de cinq expériences indépendantes. La significativité statistique est indiquée par des astérisques ** $p < 0.01$. **(C)** Immunobuvardage montrant l'expression de l'AQP2, dans les conditions indiquées, avec ou sans traitement des extraits protéiques par 100U de la PNGase pendant une heure. Ce résultat montre que ce traitement entraîne la disparition de l'étalement des bandes autour de 35 kDa, qui correspond à la forme glycosylée de l'AQP2.

Des résultats similaires ont été rapportés par l'équipe de P.Y. Martin (Hasler et al., 2002; Hasler et al., 2006; Hasler et al., 2009). Il est également important de remarquer que nos résultats montrent que la forme glycosylée est aussi diminuée après traitement des mpkCCD_{c14} avec l'apeline (n= 4), mais nos expériences ne permettent pas de conclure si l'apeline empêche la glycosylation de l'AQP2.

5. Effet sur la densité membranaire de l'AQP2

Il est bien connu que la vasopressine exerce un effet à court terme pour réguler l'expression et la fonction de l'AQP2. Cet effet se fait en contrôlant la translocation des AQP2 contenus dans les vésicules intracellulaires vers la membrane apicale (Hasler et al., 2009). Nous avons effectué des mesures de l'expression protéique de AQP2 dans les fractions cytosoliques et membranaires afin de vérifier si l'apeline réduit la densité membranaire de l'AQP2. Pour se faire, les cellules ont été traitées au niveau basolatéral par 200nM d'apeline pendant 30 min en présence d'une stimulation continue au dDAVP. Pour évaluer la pureté de nos différentes fractions, nous avons utilisé la β -lamine, la β -actine ainsi que la Na/K-ATPase comme marqueurs des fractions nucléaire, cytosolique et membranaire respectivement. Nos résultats, présentés dans la figure 24 montrent que l'AQP2 est exprimée au niveau cytosolique ainsi qu'au niveau membranaire et que l'AQP2 présente dans ces deux fractions diminue sous l'effet d'un cours traitement à l'apeline (n=3). Nos résultats suggèrent que l'effet anti-vasopressinergique de l'apeline passerait par la modulation de la localisation membranaire de l'AQP2.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons réalisé une série d'expériences d'immunofluorescence en utilisant un anticorps anti-AQP2, comme décrit dans matériels et méthodes. La figure 25A montre que l'augmentation de la densité membranaire induite par le dDAVP a fortement diminué après traitement des cellules par l'apeline pendant 30 minutes. On peut voir que cet effet est plus marqué après 60 minutes de traitement, et ce, même en présence de dDAVP. L'anticorps anti-occludine a été utilisé pour marquer les jonctions serrées de la membrane apicale. Comme montré dans la figure

25B, la moyenne de la densité membranaire de AQP2 (représentée par le rapport de l'intensité de fluorescence détectée au niveau membranaire / l'intensité de fluorescence détectée au niveau cytoplasmique), passe de $2,08 \pm 0,42$ à $0,79 \pm 0,06$ et $0,59 \pm 0,04$ après traitement à l'apeline pendant de 30 minutes et 60 minutes respectivement.

Comme mentionné au niveau de l'introduction, la phosphorylation est l'un des mécanismes moléculaires impliqués dans la maturation de l'AQP2. Plusieurs sites de phosphorylation ont été mis en évidence (Moeller et al., 2011). Il a bien été montré que la phosphorylation au niveau des résidus sérine S256 et S269 est impliquée dans la translocation de l'AQP2 des vésicules cytoplasmiques vers la membrane apicale (Moeller et al., 2009). La même équipe a montré que la forme phosphorylée S269 de l'AQP2 est exclusivement membranaire. Nous avons donc utilisé un anticorps spécifique contre cette forme (AQP2-pS269) pour évaluer l'effet d'un traitement à l'apeline sur la densité membranaire apicale de la forme phosphorylée au niveau de la sérine 269 de l'AQP2. Nos résultats présentés dans les figures 26 A-B montrent, après stimulation des cellules par l'AVP pendant 24 heures, que le traitement de ces cellules avec l'apeline pendant 30 ou 60 minutes (toujours en présence de l'AVP) a induit une diminution importante de la densité membranaire de la forme AQP2-pS269. Ces résultats suggèrent que l'apeline stimule l'endocytose et/ou la dégradation de l'AQP2 membranaire.

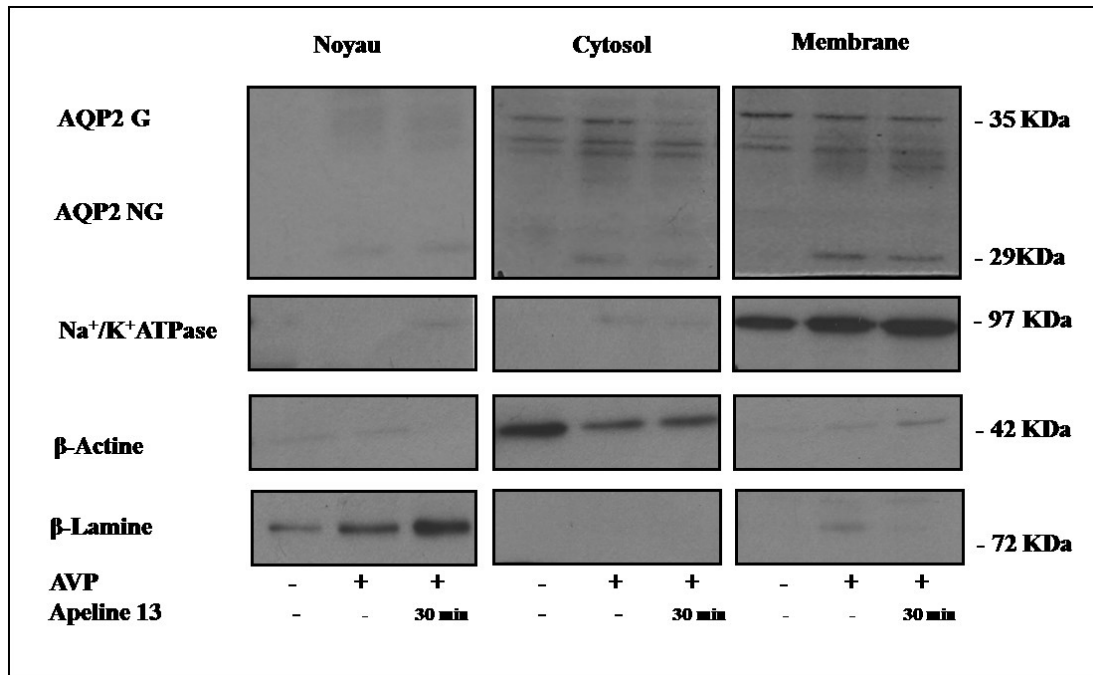


Figure 24. L'apeline diminue l'expression de l'AQP2 dans les fractions membranaires des cellules mpkCCD_{c14}. Photographie d'un gel d'immunobuvardage représentant le résultat du fractionnement des cellules mpkCCD_{c14} en l'absence de traitement, ou préalablement traitées avec le dDAVP en présence ou non d'apeline pendant 30 minutes. Les membranes ont été hybridées avec les anticorps anti-AQP2 de souris. Pour confirmer les quantités de protéines chargées à partir de chaque fraction cellulaire, la détection de la β-lamine, de la β-actine et de la Na/K-ATPase a été effectuée respectivement pour les fractions nucléaire, cytosolique et membranaire.

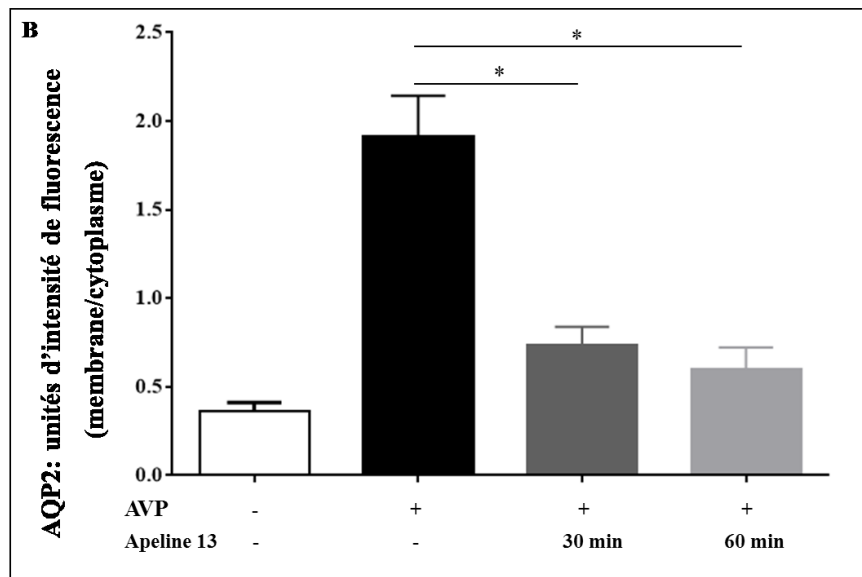
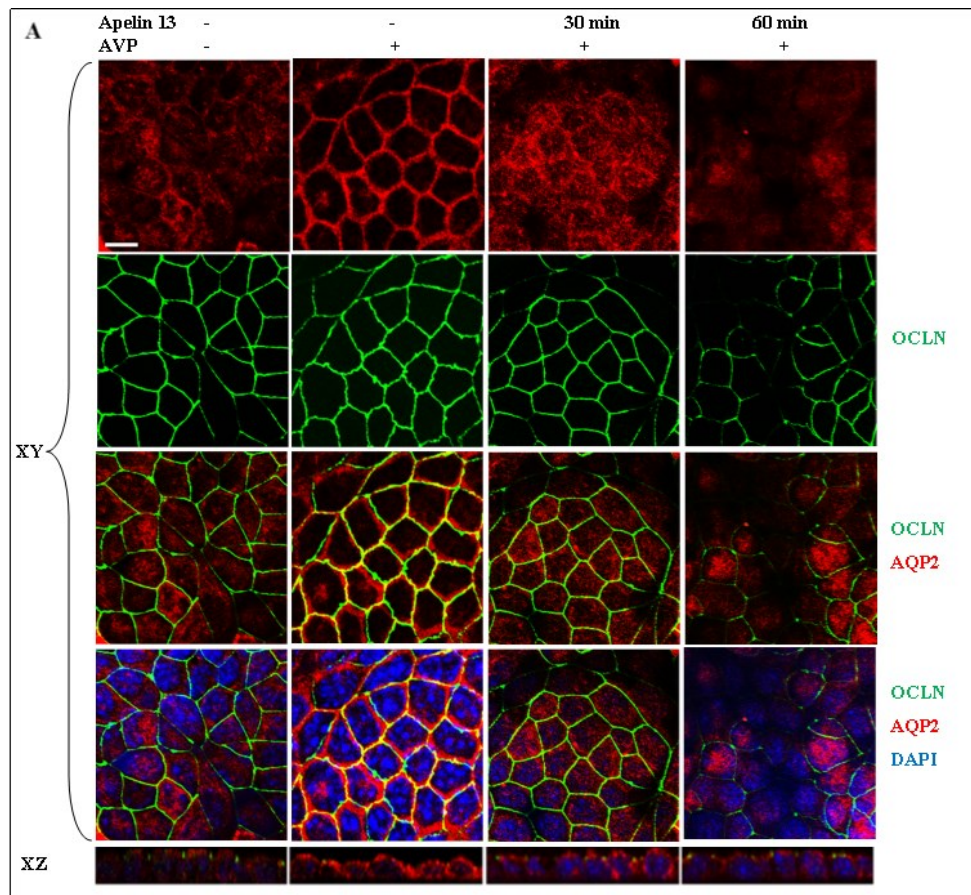


Figure 25. Immunolocalisation de l'AQP2 dans les cellules mpkCCD_{c14} en réponse au traitement par la dDAVP et l'apeline. (A) Les cellules mpkCCD_{c14} ont été ensemencées sur filtre de polycarbonate, jusqu'à ce que la résistance transépithéliale ait atteint la valeur optimale pour le début du traitement. Les cellules ont été soit laissées sans traitement (colonne 1), soit préalablement traitées avec le dDAVP pendant 24 heures (colonne 2), ou bien traitées 24 heures avec la dDAVP suivi d'un ajout de l'apeline pendant 30 minutes (colonne 3) ou 60 minutes (colonne 4). Un double marquage immunofluorescent a été réalisé utilisant des anticorps reconnaissant toute les formes de l'AQP2 (signal rouge) et des anticorps pour la détection de l'occludine (signal vert) qui est localisées dans les jonctions serrées et utilisée donc comme marqueur de la membrane cytoplasmique. Les noyaux sont marqués en bleu par le DAPI. Les images obtenues en microscopie confocale sont montrées dans les deux axes XY et XZ. Échelle = 5µm. **(B).** Histogramme montrant le résultat de la mesure de la fluorescence du marquage de l'AQP2 dans les compartiments membranaire et cytosolique des cellules mpkCCD_{c14}. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes ± SEM (*p< 0.01).

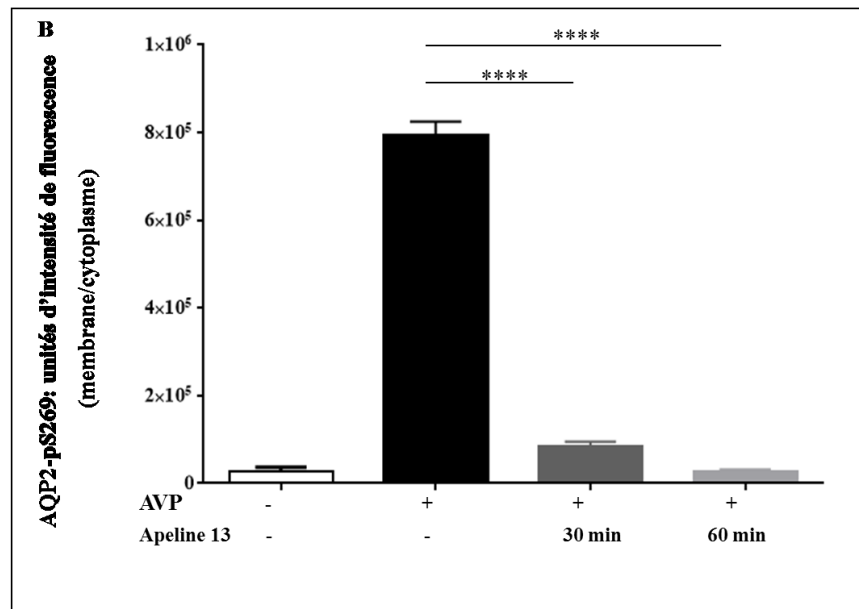
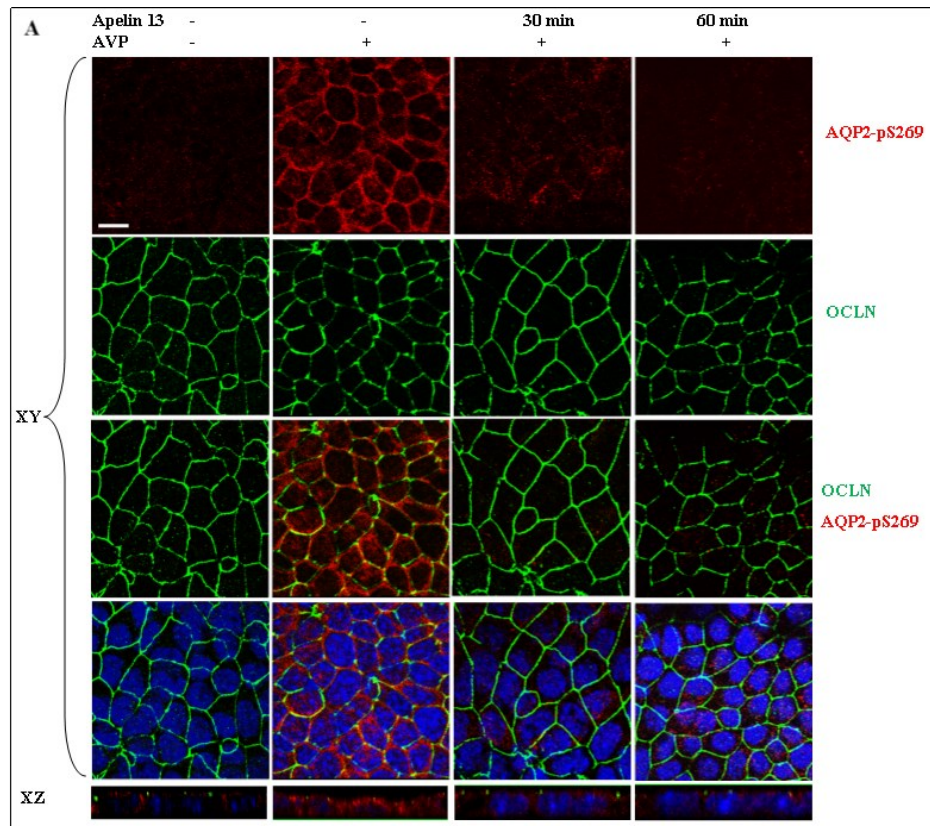


Figure 26. Images d'immunofluorescence représentative de l'effet de l'apeline sur la localisation de la forme phosphorylée de l'AQP2 (AQP2-pS269) dans les cellules mpkCCD_{c14}. (A) Les conditions de culture et de traitement sont les mêmes que décrits dans la figure 25. Un double marquage immunofluorescent a été réalisé utilisant des anticorps reconnaissant la forme phosphorylée de l'AQP2 (AQP2-pS269, signal rouge) et des anticorps pour la détection de l'occludine (signal vert). Les noyaux sont marqués en bleu par le DAPI. Des images représentatives ont été obtenues par microscopie confocale et elles sont montrées dans les deux axes XY et XZ. Échelle = 5µm. **(B).** Histogramme montrant le résultat de la mesure de l'intensité de la fluorescence du marquage de l'AQP2-pS269 dans les compartiments membranaire et cytosolique des cellules mpkCCD_{c14}. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes ± SEM (****p< 0.00001).

DISCUSSION

L'AQP2 est exprimée dans le tube collecteur du rein au niveau du pôle apical des cellules principales et constitue un des canaux hydriques indispensables pour la réabsorption de l'eau à partir de l'urine. L'AQP2 est une cible privilégiée de l'AVP en termes de régulation de son expression et de sa localisation à la membrane apicale dans le but d'augmenter la réabsorption de l'eau au niveau du tube collecteur (Sun et al., 2002; Kortenoeven et al., 2012; Moeller et Fenton, 2012). L'apeline est connue pour son action antivasopressinergique au niveau central (Llorens-Cortes et Beaudet, 2005) mais son rôle au niveau du rein n'est pas très bien connu. En utilisant les cellules mpkCCD_{C14} (une lignée cellulaire bien caractérisée pour l'étude, *in vitro*, des fonctions des cellules principales du tube collecteur), nous avons démontré pour la première fois, que l'apeline entraîne une régulation à la baisse de l'expression et de la distribution membranaire de l'AQP2.

L'effet connu et indirect de l'apeline sur l'augmentation de l'élimination de l'eau, consiste à réduire la sécrétion de l'AVP au niveau des neurones vasopressinergiques centraux (Bodineau et al., 2010). Cette action a un effet vasodilatateur au niveau glomérulaire (Hus-Citharel et al., 2008) ce qui réduit le débit glomérulaire. Des études ont montré précédemment que le récepteur de l'apeline, l'APJ, est présent au niveau des motoneurones vasopressinergiques (De Mota et al., 2004), au niveau des cellules endothéliales et également au niveau rénal, plus particulièrement, au niveau des glomérules (O'Carroll et al., 2000; Hus-Citharel et al., 2008). Dans notre étude, nous rapportons pour la première fois que le récepteur APJ est présent dans les cellules issues des tubules collecteurs de néphron de souris, les mpkCCD_{C14}. Ceci suggère fortement que l'action de l'apeline que nous avons observée est périphérique et elle se fait par l'intermédiaire de ce récepteur.

1. L'apeline antagonise l'effet de l'AVP et diminue l'expression de l'AQP2 à court et à long terme, dans les cellules principales du tube collecteur rénal.

Récemment, Llorens-Cortes et son équipe ont rapporté que l'apeline-17 induit, *in vivo*, une augmentation de la diurèse et une diminution de l'osmolarité urinaire en neutralisant

l'action de l'AVP sur l'adressage membranaire de l'AQP2 au niveau des cellules de la médulla rénale chez des rates lactantes (Hus-Citharel et al., 2014), mais sans démontrer le caractère direct de cet effet. Par contre ces résultats n'ont pas été démontrés dans des modèles cellulaires, *in vitro*, comme nous rapportons dans cette étude. Il est important de mentionner que la réabsorption de l'eau au niveau des cellules principales du tube collecteur est principalement assurée par l'AQP2 et que cette protéine est exprimée à la surface de la membrane apicale de ces cellules (Nielsen et al., 2002) alors que les AQP3 et AQP4 sont présentes au niveau du pôle basolatéral de ces cellules. D'autre part, il est bien établi que l'AVP est l'hormone clé responsable de la régulation de l'expression et de la translocation de l'AQP2 à partir des vésicules de transport vers la surface membranaire au niveau des cellules du néphron distal (Nielsen et al., 2002; Wilson et al., 2013). Comme nous l'avons confirmé dans nos expériences, différentes études ont montré que le traitement des cellules avec l'AVP pendant 24 heures augmente l'expression de l'AQP2 à la fois au niveau du transcrit et au niveau des protéines (Nielsen et al., 1993; Hasler et al., 2002; Kortenoeven et al., 2012). Nous avons observé que 8 heures de traitement de ces cellules par l'apeline et en présence de l'AVP, est suffisante pour induire une réduction de 65% des quantités de l'ARNm de l'AQP2 en comparaison avec des mpkCCD_{c14} traitées par l'AVP seule. Ce résultat peut être expliqué par le fait que l'apeline régule l'expression de l'AQP2 par une ou des voies de signalisations communes avec celle de l'AVP. En effet, la liaison de l'apeline à son récepteur APJ, exprimé dans les cellules mpkCCD_{c14}, entraîne une baisse de la production d'AMPc et de ce fait une diminution de la phosphorylation du PKA (O'Carroll et al., 2013; Hus-Citharel et al., 2014), et donc une baisse de la transcription du gène de l'AQP2 (figure 27). Il est à noter que l'AVP augmente la transcription de l'ARNm de l'AQP2 indépendamment de la stabilité et la dégradation de cette protéine (Hasler et al., 2009). En plus de l'effet transcriptionnel de l'apeline, ce neuropeptide pourrait entraîner une augmentation de la dégradation de l'AQP2 au niveau protéique. Ce dernier effet pourrait être vérifié par la réalisation d'une cinétique d'inhibition de la synthèse protéique par la cycloheximide, dans les différentes conditions de nos expériences.

Plusieurs voies de signalisation sont connues pour être modulées par l'apeline une fois liée à son récepteur APJ. Parmi ces voies, on peut citer les voies PI3K/Akt, NFκB/JNK et RAS/MEK/ERK et l'AMPc/PKA (O'Carroll et al., 2013; Yu et al., 2014). L'AVP une fois liée à son récepteur V₂R entraîne l'activation de l'adényl cyclase ce qui entraîne l'augmentation de la production de l'AMPc. Ce dernier active la PKA, qui à son tour active CREB et/ou AP-1. Une fois dans le noyau, ces deux facteurs vont activer la transcription du gène de l'AQP2 (Montminy, 1997; Hasler et al., 2009; Holmes, 2012). Il n'est donc pas écarté que la baisse de l'ARNm par l'action de l'apeline dans les mpkCCD_{c14} puisse être secondaire à un effet contraire à celui de l'AVP sur la production de l'AMPc et donc la désactivation de la PKA. Dans ce contexte, la mesure des quantités d'AMPc et la phosphorylation de la PKA dans les mpkCCD_{c14} peuvent confirmer cette hypothèse.

Dans les cellules mpkCCD_{c14}, l'AQP2 existe sous deux formes; non glycosylée (29 kDa) et glycosylée (35 kDa). Comme rapporté dans des études récentes (Hasler et al., 2009; Moeller et al., 2011), l'AQP2 comporte plusieurs sites de glycosylation. Elle apparaît sur le gel d'immunobuvardage sous forme d'une bande à 29 kD, correspondant à la forme non glycosylée et sous plusieurs bandes, autour de 35 kDa correspondant à la forme glycosylée de l'AQP2. Le traitement des extraits protéiques par une enzyme de déglycosylation nous a permis de confirmer que les bandes observées en autour de 35 kD, correspondent à la forme glycosylée de l'AQP2 et que l'anticorps qu'on a utilisé détecte spécifiquement l'AQP2. Ces deux formes, glycosylée et non glycosylée de l'AQP2, ont été observées en immunofluorescence au niveau de la membrane apicale des cellules du tube collecteur du rein (Hendriks et al., 2004). Hasler et collaborateur ont montré que le niveau de ces deux bandes augmente après stimulation à l'AVP (Hasler et al., 2006). D'autre part, il a été signalé que la N-glycosylation des AQP2 peut induire la stabilisation de la protéine (Buck et al., 2004) ce qui va réduire sa dégradation. Dans nos résultats, le fait que l'apeline réduit les quantités de la forme glycosylée de l'AQP2 pourrait expliquer, en partie, son effet sur les quantités d'AQP2. Il serait intéressant d'étudier de façon plus précise le mécanisme par lequel l'apeline entraîne la déglycosylation de l'AQP2.

2. L'apeline réduit la quantité d'AQP2 présente à la membrane apicale des cellules mpkCCD_{c14}, même en présence de l'AVP.

Tel que démontré précédemment (Nielsen et al., 1993), nous avons observé que l'AVP entraîne la translocation de l'AQP2 à des temps courts (30 minutes et une heure). De plus, nous démontrons par immunolocalisation et par fractionnement subcellulaire, que l'apeline a un effet anti-AVP très rapide et que ce neuropeptide entraîne une baisse de l'AQP2 au niveau de la membrane apicale. Ce résultat est en accord avec l'effet de l'apeline-17 sur la distribution de l'AQP2, observé *in vivo* après une heure de traitement (Hus-Citharel et al., 2014). Par ailleurs, il a été montré dans les cellules endothéliales que l'activation du récepteur APJ peut se faire quelques minutes après stimulation par l'apeline (Lee et al., 2000; Japp et al., 2008). Dans ce modèle, l'apeline active directement l'APJ et la production de l'eNOS qui s'en suit, via la voie Akt et PLCY, conduit à la libération du NO et à la relaxation vasculaire rapide par le relâchement des cellules musculaires lisses. Cette voie n'est pas connue pour être activée dans l'action de l'apeline au niveau des cellules rénales.

D'autre part, l'AVP induit de façon rapide la translocation de l'AQP2 des vésicules de transport vers la membrane apicale par l'activation des voies Akt/AS160 (Jung et Kwon, 2010) et AMPc/PKA (Moeller et al., 2011). Llorens-Cortes et son équipe ont montré que l'apeline-17 réduit l'activation de l'AMPc et perturbe la distribution intracellulaire du Ca^{2+} (Hus-Citharel et al., 2014). Cet effet a été démontré dans le processus d'exocytose de l'AQP2 (Yip et al., 2015) où l'AVP induit une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et la mobilisation des vésicules d'exocytose vers la membrane apicale dans les cellules du tube collecteur du rein des rats perfusés. Le mécanisme exact de ce dernier phénomène n'a pas été clairement élucidé. Il est également connu que c'est par le biais du PKA que l'AQP2 est phosphorylée sur la sérine 256. La phosphorylation de ce résidu est nécessaire au processus de translocation et d'accumulation de l'AQP2 à la membrane plasmique. De plus, il a été montré que cette phosphorylation est détectée à la fois dans les vésicules de transport intracellulaire et dans la membrane apicale. Il a également été montré que la phosphorylation de l'AQP2 sur la sérine 256 mène à la phosphorylation de la sérine 269

et que cette forme est présente uniquement au niveau de la membrane apicale (Moeller et al., 2010; Fenton et al., 2013). Cette propriété justifie notre choix de l'utilisation d'anticorps qui reconnaissent la forme phosphorylée de l'AQP2 (AQP-p269) présente au niveau de la membrane apicale et non dans les vésicules. Il a été rapporté que cette phosphorylation empêche l'internalisation de l'AQP2 et son interaction avec la machinerie de l'endocytose. Ainsi, la quantité d'AQP2 phosphorylée sur la serine 269 pourrait représenter la quantité d'AQP2 présente au niveau de la membrane plasmique. En ciblant cette forme phosphorylée de l'AQP2 par un anticorps spécifique nous avons démontré que l'apeline réduit, rapidement et même en présence d'AVP, la quantité d'AQP2 présente au niveau de la membrane apicale en permettant donc son internalisation ou dégradation.

Pris ensemble, l'apeline, en se liant à son récepteur l'APJ, contrebalance l'action de l'AVP sur l'expression et la distribution de l'AQP2 dans la cellule ce qui permettrait une baisse de l'absorption de l'eau par les cellules du tube collecteur même en présence de l'AVP. Comme mentionné plus haut, plusieurs voies de signalisation peuvent être impliquées suite à l'activation du récepteur APJ par l'apeline (O'Carroll et al., 2013; Quillon et al., 2015). Sachant que ces voies sont aussi modulées par l'action de l'AVP, il n'est donc pas écarté que les seconds messagers impliqués dans ces différentes voies de signalisation (tels que le calcium intracellulaire, l'AMPc ou le NO) pourraient être moduler par l'action anti-vasopressinergique de l'apeline sur la régulation de l'expression et la distribution de l'AQP2. D'autre part, une étude récente effectuée sur des cellules endothéliales, a montré que la liaison de l'apeline à l'APJ entraîne une dimérisation de ce dernier avec le récepteur de l'angiotensine II empêchant son activation par son ligand (Siddiquee et al., 2013). Une liaison de l'APJ au V₂R pourrait aussi expliquer l'effet antagoniste de l'apeline sur l'activité de l'AVP observée à court et à long terme au niveau des cellules principales du tube collecteur. D'autres études incluant des techniques d'immunoprécipitation sont nécessaires pour identifier les mécanismes exacts impliqués dans ces actions de l'apeline.

CONCLUSION :

Dans cette étude nous avons utilisé la lignée cellulaire mpkCCD_{c14}, un modèle de choix pour l'étude des fonctions des cellules principales du tubule collecteur, pour démontrer que ces cellules expriment de façon constitutive l'APJ, connu actuellement comme l'unique récepteur pour l'apeline. Nous avons également montré qu'en plus de son effet central, l'apeline-13 a un effet anti-vasopressinergique périphérique rénal. Nos résultats suggèrent que l'apeline contrebalance l'effet de l'AVP en diminuant, de façon rapide et à long terme, l'expression de l'AQP2 ainsi que sa relocalisation de la membrane apicale vers le cytosol des cellules. Cet effet périphérique est en accord avec l'action centrale de l'apeline dont le but ultime est de diminuer la réabsorption de l'eau par les cellules principales du tube collecteur du rein. Notre étude apporte une nouvelle compréhension de l'action de l'apeline dans la régulation de l'équilibre hydrique par les reins.

REMERCIEMENTS :

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de travail Pr Ahmed Chraibi pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et donner la chance de faire cette formation de maitrise, et travailler avec beaucoup d'enthousiasme sur ce projet très intéressant. Je le remercie aussi pour sa confiance en moi, son écoute, sa compréhension, son aide et ses conseils.

Je remercie également mes très chers parents, et ma grand-mère pour leur soutien et encouragement malgré l'éloignement.

Un très grand merci à Salah, mon très cher mari, qui a été toujours présent pour m'aider, et qui apporte une grande contribution dans toutes mes réussites.

J'aimerais également remercier Pr Pedro-Miguel Geraldès, et Pr Mannix Auger-Messier pour avoir accepté de corriger et évaluer mon travail.

LISTE DES RÉFÉRENCES :

- Abramoff, M. D. (2004). "Image Processing with ImageJ." *Biophotonics International* **volume 11**(issue 7): pp. 36-42.
- Acher, R., J. Chauvet, et al. (2002). "Dynamic processing of neuropeptides: sequential conformation shaping of neurohypophysial preprohormones during intraneuronal secretory transport." *J Mol Neurosci* **18**(3): 223-228.
- Aiyar, N., P. Nambi, et al. (1986). "Vascular vasopressin receptors mediate phosphatidylinositol turnover and calcium efflux in an established smooth muscle cell line." *Life Sci* **39**(1): 37-45.
- Bai, L., K. Fushimi, et al. (1996). "Structure of aquaporin-2 vasopressin water channel." *J Biol Chem* **271**(9): 5171-5176.
- Balasubramanian, L., J. S. Sham, et al. (2008). "Calcium signaling in vasopressin-induced aquaporin-2 trafficking." *Pflugers Arch* **456**(4): 747-754.
- Baumgarten, R., M. H. Van De Pol, et al. (1998). "Glycosylation is not essential for vasopressin-dependent routing of aquaporin-2 in transfected Madin-Darby canine kidney cells." *J Am Soc Nephrol* **9**(9): 1553-1559.
- Bodineau, L., A. Hus-Citharel, et al. (2010). "[Contribution of apelin to water balance, blood glucose control, and cardiovascular functions]." *Ann Endocrinol (Paris)* **71**(4): 249-256.
- Bouley, R., N. Pastor-Soler, et al. (2005). "Stimulation of AQP2 membrane insertion in renal epithelial cells in vitro and in vivo by the cGMP phosphodiesterase inhibitor sildenafil citrate (Viagra)." *Am J Physiol Renal Physiol* **288**(6): F1103-1112.
- Buck, T. M., J. Eledge, et al. (2004). "Evidence for stabilization of aquaporin-2 folding mutants by N-linked glycosylation in endoplasmic reticulum." *Am J Physiol Cell Physiol* **287**(5): C1292-1299.
- Chaves-Almagro, C., I. Castan-Laurell, et al. (2015). "Apelin receptors: From signaling to antidiabetic strategy." *Eur J Pharmacol* **763**(Pt B): 149-159.
- Cui, R. R., D. A. Mao, et al. (2010). "Apelin suppresses apoptosis of human vascular smooth muscle cells via APJ/PI3-K/Akt signaling pathways." *Amino Acids* **39**(5): 1193-1200.
- De Mota, N., Z. Lenkei, et al. (2000). "Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor." *Neuroendocrinology* **72**(6): 400-407.
- De Mota, N., A. Reaux-Le Goazigo, et al. (2004). "Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(28): 10464-10469.
- de Seigneux, S., J. Nielsen, et al. (2007). "Long-term aldosterone treatment induces decreased apical but increased basolateral expression of AQP2 in CCD of rat kidney." *Am J Physiol Renal Physiol* **293**(1): F87-99.
- DiGiovanni, S. R., S. Nielsen, et al. (1994). "Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(19): 8984-8988.
- Dong, W., B. Seidel, et al. (1997). "Cellular localization of the prohormone convertases in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei: selective regulation of PC1 in corticotrophin-releasing hormone parvocellular neurons mediated by glucocorticoids." *J Neurosci* **17**(2): 563-575.
- Duong Van Huyen, J., M. Bens, et al. (1998). "Differential effects of aldosterone and vasopressin on chloride fluxes in transimmortalized mouse cortical collecting duct cells." *J Membr Biol* **164**(1): 79-90.

- El Messari, S., X. Iturrioz, et al. (2004). "Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure." *J Neurochem* **90**(6): 1290-1301.
- Fenton, R. A., C. N. Pedersen, et al. (2013). "New insights into regulated aquaporin-2 function." *Curr Opin Nephrol Hypertens* **22**(5): 551-558.
- Finley, J. J. t., M. A. Konstam, et al. (2008). "Arginine vasopressin antagonists for the treatment of heart failure and hyponatremia." *Circulation* **118**(4): 410-421.
- Firemark, H. M. and R. E. Weitzman (1979). "Effects of beta-endorphin, morphine and naloxone on arginine vasopressin secretion and the electroencephalogram." *Neuroscience* **4**(12): 1895-1902.
- Focosi, D. (2014). "PHYSIOLOGY OF ADULT HOMO SAPIENS - URINARY APPARATUS." *Molecular Medicine*, from http://www.ufrgs.br/immunovet/molecular_immunology/kidney.html.
- Fushimi, K., S. Sasaki, et al. (1994). "Functional characterization and cell immunolocalization of AQP-CD water channel in kidney collecting duct." *Am J Physiol* **267**(4 Pt 2): F573-582.
- Guyton, A. C. and J. E. Hall (2000). *Textbook of medical physiology*. Philadelphia, Saunders.
- Hara, M. and A. S. Verkman (2003). "Glycerol replacement corrects defective skin hydration, elasticity, and barrier function in aquaporin-3-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(12): 7360-7365.
- Hashimoto, T., M. Kihara, et al. (2006). "Apelin stimulates myosin light chain phosphorylation in vascular smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(6): 1267-1272.
- Hasler, U., V. Leroy, et al. (2009). "Aquaporin-2 abundance in the renal collecting duct: new insights from cultured cell models." *Am J Physiol Renal Physiol* **297**(1): F10-18.
- Hasler, U., D. Mordasini, et al. (2002). "Long term regulation of aquaporin-2 expression in vasopressin-responsive renal collecting duct principal cells." *J Biol Chem* **277**(12): 10379-10386.
- Hasler, U., S. Nielsen, et al. (2006). "Posttranscriptional control of aquaporin-2 abundance by vasopressin in renal collecting duct principal cells." *Am J Physiol Renal Physiol* **290**(1): F177-187.
- Hayashi, M., S. Sasaki, et al. (1994). "Expression and distribution of aquaporin of collecting duct are regulated by vasopressin V2 receptor in rat kidney." *J Clin Invest* **94**(5): 1778-1783.
- Hendriks, G., M. Koudijs, et al. (2004). "Glycosylation is important for cell surface expression of the water channel aquaporin-2 but is not essential for tetramerization in the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **279**(4): 2975-2983.
- Hibuse, T., N. Maeda, et al. (2005). "Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(31): 10993-10998.
- Hoffert, J. D., R. A. Fenton, et al. (2008). "Vasopressin-stimulated increase in phosphorylation at Ser269 potentiates plasma membrane retention of aquaporin-2." *J Biol Chem* **283**(36): 24617-24627.
- Holmes, R. P. (2012). "The role of renal water channels in health and disease." *Mol Aspects Med* **33**(5-6): 547-552.
- Hosoya, M., Y. Kawamata, et al. (2000). "Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin." *J Biol Chem* **275**(28): 21061-21067.
- Hus-Citharel, A., L. Bodineau, et al. (2014). "Apelin counteracts vasopressin-induced water reabsorption via cross talk between apelin and vasopressin receptor signaling pathways in the rat collecting duct." *Endocrinology* **155**(11): 4483-4493.

- Hus-Citharel, A., N. Bouby, et al. (2008). "Effect of apelin on glomerular hemodynamic function in the rat kidney." *Kidney Int* **74**(4): 486-494.
- Ishibashi, K., S. Hara, et al. (2009). "Aquaporin water channels in mammals." *Clin Exp Nephrol* **13**(2): 107-117.
- Japp, A. G., N. L. Cruden, et al. (2008). "Vascular effects of apelin in vivo in man." *J Am Coll Cardiol* **52**(11): 908-913.
- Jennette, J. C. and R. H. Heptinstall (2007). *Heptinstall's pathology of the kidney*. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins.
- Jung, H. J. and T. H. Kwon (2010). "Membrane Trafficking of Collecting Duct Water Channel Protein AQP2 Regulated by Akt/AS160." *Electrolyte Blood Press* **8**(2): 59-65.
- Kleinz, M. J. and A. P. Davenport (2005). "Emerging roles of apelin in biology and medicine." *Pharmacol Ther* **107**(2): 198-211.
- Klussmann, E., K. Maric, et al. (1999). "Protein kinase A anchoring proteins are required for vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells." *J Biol Chem* **274**(8): 4934-4938.
- Kortenoeven, M. L. and R. A. Fenton (2014). "Renal aquaporins and water balance disorders." *Biochim Biophys Acta* **1840**(5): 1533-1549.
- Kortenoeven, M. L., C. Trimpert, et al. (2012). "In mpkCCD cells, long-term regulation of aquaporin-2 by vasopressin occurs independent of protein kinase A and CREB but may involve Epac." *Am J Physiol Renal Physiol* **302**(11): F1395-1401.
- Lee, D. K., R. Cheng, et al. (2000). "Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor." *J Neurochem* **74**(1): 34-41.
- Levin, M. H., S. Sullivan, et al. (2006). "Hypertonic saline therapy in cystic fibrosis: Evidence against the proposed mechanism involving aquaporins." *J Biol Chem* **281**(35): 25803-25812.
- Li, C., W. Wang, et al. (2011). "Molecular mechanisms of angiotensin II stimulation on aquaporin-2 expression and trafficking." *Am J Physiol Renal Physiol* **300**(5): F1255-1261.
- Liu, C., T. Su, et al. (2010). "PI3K/Akt signaling transduction pathway is involved in rat vascular smooth muscle cell proliferation induced by apelin-13." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **42**(6): 396-402.
- Liu, W. C., C. C. Wu, et al. (2016). "Pleiotropic effects of vitamin D in chronic kidney disease." *Clin Chim Acta* **453**: 1-12.
- Llorens-Cortes, C. and A. Beaudet (2005). "[Apelin, a neuropeptide that counteracts vasopressin secretion]." *Med Sci (Paris)* **21**(8-9): 741-746.
- Lolait, S. J., A. M. O'Carroll, et al. (1992). "Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus." *Nature* **357**(6376): 336-339.
- Loo, C. S., C. W. Chen, et al. (2013). "Quantitative apical membrane proteomics reveals vasopressin-induced actin dynamics in collecting duct cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(42): 17119-17124.
- Ma, T., Y. Song, et al. (2000). "Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking aquaporin-3 water channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(8): 4386-4391.
- Madsen, K. M. and C. C. Tisher (1986). "Structural-functional relationships along the distal nephron." *Am J Physiol* **250**(1 Pt 2): F1-15.
- Martin, N. P., R. J. Lefkowitz, et al. (2003). "Regulation of V2 vasopressin receptor degradation by agonist-promoted ubiquitination." *J Biol Chem* **278**(46): 45954-45959.
- Masri, B., N. Morin, et al. (2006). "The apelin receptor is coupled to Gi1 or Gi2 protein and is differentially desensitized by apelin fragments." *J Biol Chem* **281**(27): 18317-18326.

- Medhurst, A. D., C. A. Jennings, et al. (2003). "Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin." *J Neurochem* **84**(5): 1162-1172.
- Melmed, S. (2011). *The pituitary*. Amsterdam ; Boston, Academic Press.
- Mills, S. E. (2007). *Histology for pathologists*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Moeller, H. B. and R. A. Fenton (2012). "Cell biology of vasopressin-regulated aquaporin-2 trafficking." *Pflugers Arch* **464**(2): 133-144.
- Moeller, H. B., N. MacAulay, et al. (2009). "Role of multiple phosphorylation sites in the COOH-terminal tail of aquaporin-2 for water transport: evidence against channel gating." *Am J Physiol Renal Physiol* **296**(3): F649-657.
- Moeller, H. B., E. T. Olesen, et al. (2011). "Regulation of the water channel aquaporin-2 by posttranslational modification." *Am J Physiol Renal Physiol* **300**(5): F1062-1073.
- Moeller, H. B., J. Praetorius, et al. (2010). "Phosphorylation of aquaporin-2 regulates its endocytosis and protein-protein interactions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(1): 424-429.
- Montminy, M. (1997). "Transcriptional regulation by cyclic AMP." *Annu Rev Biochem* **66**: 807-822.
- Morgenthaler, N. G. (2010). "Copeptin: a biomarker of cardiovascular and renal function." *Congest Heart Fail* **16 Suppl 1**: S37-44.
- Morishita, Y., T. Matsuzaki, et al. (2005). "Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule." *Mol Cell Biol* **25**(17): 7770-7779.
- Nejsum, L. N., M. Zelenina, et al. (2005). "Bidirectional regulation of AQP2 trafficking and recycling: involvement of AQP2-S256 phosphorylation." *Am J Physiol Renal Physiol* **288**(5): F930-938.
- Nicolet-Barousse L, Tarek Sharshar, Michel Paillard, Anne Blanchard. "La vasopressine : une hormone aux multiples fonctions". *Médecine thérapeutique / Endocrinologie*. Volume 3, Issue 4.322-9. 2001.
- Nielsen, S., C. L. Chou, et al. (1995). "Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(4): 1013-1017.
- Nielsen, S., S. R. DiGiovanni, et al. (1993). "Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(24): 11663-11667.
- Nielsen, S., J. Frokiaer, et al. (2002). "Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine." *Physiol Rev* **82**(1): 205-244.
- Noda, Y., E. Sohara, et al. (2010). "Aquaporins in kidney pathophysiology." *Nat Rev Nephrol* **6**(3): 168-178.
- O'Carroll, A. M., S. J. Lolait, et al. (2013). "The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis." *J Endocrinol* **219**(1): R13-35.
- O'Carroll, A. M., T. L. Selby, et al. (2000). "Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues." *Biochim Biophys Acta* **1492**(1): 72-80.
- Orloff, J. and J. Handler (1967). "The role of adenosine 3',5'-phosphate in the action of antidiuretic hormone." *Am J Med* **42**(5): 757-768.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9): e45.
- Polito, A., R. Sonnevile, et al. (2011). "Changes in CRH and ACTH synthesis during experimental and human septic shock." *PLoS One* **6**(11): e25905.
- Preston, G. M., T. P. Carroll, et al. (1992). "Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein." *Science* **256**(5055): 385-387.

- Procino, G., M. Carmosino, et al. (2003). "Ser-256 phosphorylation dynamics of Aquaporin 2 during maturation from the ER to the vesicular compartment in renal cells." *FASEB J* **17**(13): 1886-1888.
- Quillon, A., B. Fromy, et al. (2015). "Endothelium microenvironment sensing leading to nitric oxide mediated vasodilation: a review of nervous and biomechanical signals." *Nitric Oxide* **45**: 20-26.
- Rao, U. S., J. M. Baker, et al. (2004). "Role of intracellular Ca²⁺ in the expression of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel." *Cell Calcium* **35**(1): 21-28.
- Reaux, A., N. De Mota, et al. (2001). "Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain." *J Neurochem* **77**(4): 1085-1096.
- Roberts, E. M., M. J. Newson, et al. (2009). "Abnormal fluid homeostasis in apelin receptor knockout mice." *J Endocrinol* **202**(3): 453-462.
- Rousseau-Merck, M. F., P. Rene, et al. (1995). "Chromosomal localization of the human V3 pituitary vasopressin receptor gene (AVPR3) to 1q32." *Genomics* **30**(2): 405-406.
- Rowe, V. and J. Parr (1980). "Pineal cells enhance choline acetyltransferase activity in sympathetic neurons." *J Neurobiol* **11**(6): 547-556.
- Russell, J. T., M. J. Brownstein, et al. (1980). "Biosynthesis of vasopressin, oxytocin, and neurophysins: isolation and characterization of two common precursors (propressophysin and prooxyphysin)." *Endocrinology* **107**(6): 1880-1891.
- Sabolic, I., T. Katsura, et al. (1995). "The AQP2 water channel: effect of vasopressin treatment, microtubule disruption, and distribution in neonatal rats." *J Membr Biol* **143**(3): 165-175.
- Saito, M., T. Sugimoto, et al. (1995). "Molecular cloning and characterization of rat V1b vasopressin receptor: evidence for its expression in extra-pituitary tissues." *Biochem Biophys Res Commun* **212**(3): 751-757.
- Sarmiento, J. M., P. Ehrenfeld, et al. (2005). "Differential distribution of the vasopressin V receptor along the rat nephron during renal ontogeny and maturation." *Kidney Int* **68**(2): 487-496.
- Sasaki, S. (2012). "Aquaporin 2: from its discovery to molecular structure and medical implications." *Mol Aspects Med* **33**(5-6): 535-546.
- Sasaki, S., K. Fushimi, et al. (1994). "Cloning, characterization, and chromosomal mapping of human aquaporin of collecting duct." *J Clin Invest* **93**(3): 1250-1256.
- Siddiquee, K., J. Hampton, et al. (2013). "The apelin receptor inhibits the angiotensin II type 1 receptor via allosteric trans-inhibition." *Br J Pharmacol* **168**(5): 1104-1117.
- Silberstein, C., A. Kierbel, et al. (1999). "Functional characterization and localization of AQP3 in the human colon." *Braz J Med Biol Res* **32**(10): 1303-1313.
- Sun, T. X., A. Van Hoek, et al. (2002). "Aquaporin-2 localization in clathrin-coated pits: inhibition of endocytosis by dominant-negative dynamin." *Am J Physiol Renal Physiol* **282**(6): F998-1011.
- Szokodi, I., P. Tavi, et al. (2002). "Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility." *Circ Res* **91**(5): 434-440.
- Takata, K., T. Matsuzaki, et al. (2008). "Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney." *Histochem Cell Biol* **130**(2): 197-209.
- Tatemoto, K., M. Hosoya, et al. (1998). "Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **251**(2): 471-476.
- Terada, Y., K. Tomita, et al. (1993). "Different localization and regulation of two types of vasopressin receptor messenger RNA in microdissected rat nephron segments using reverse transcription polymerase chain reaction." *J Clin Invest* **92**(5): 2339-2345.

- Thibonnier, M., D. M. Conarty, et al. (1998). "Molecular pharmacology of human vasopressin receptors." *Adv Exp Med Biol* **449**: 251-276.
- Thibonnier, M., M. K. Graves, et al. (1996). "Structure, sequence, expression, and chromosomal localization of the human V1a vasopressin receptor gene." *Genomics* **31**(3): 327-334.
- Thomas, S. V., P. P. Kathpalia, et al. (2011). "Epithelial sodium channel regulation by cell surface-associated serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1." *J Biol Chem* **286**(37): 32074-32085.
- Trimpert, C., D. T. van den Berg, et al. (2012). "Vasopressin increases S261 phosphorylation in AQP2-P262L, a mutant in recessive nephrogenic diabetes insipidus." *Nephrol Dial Transplant* **27**(12): 4389-4397.
- Ufer, E., R. Postina, et al. (1995). "An extracellular residue determines the agonist specificity of V2 vasopressin receptors." *FEBS Lett* **362**(1): 19-23.
- van Balkom, B. W., M. Boone, et al. (2009). "LIP5 interacts with aquaporin 2 and facilitates its lysosomal degradation." *J Am Soc Nephrol* **20**(5): 990-1001.
- Vaughan, D. W. (2002). "A Learning System in Histology: CD-ROM and Guide." 2002, from <http://www.bu.edu/histology/>.
- Wildman, S. S., M. Boone, et al. (2009). "Nucleotides downregulate aquaporin 2 via activation of apical P2 receptors." *J Am Soc Nephrol* **20**(7): 1480-1490.
- Wilson, J. L., C. A. Miranda, et al. (2013). "Vasopressin and the regulation of aquaporin-2." *Clin Exp Nephrol* **17**(6): 751-764.
- Yamamoto, T., S. Sasaki, et al. (1995). "Vasopressin increases AQP-CD water channel in apical membrane of collecting duct cells in Brattleboro rats." *Am J Physiol* **268**(6 Pt 1): C1546-1551.
- Yasui, M., S. M. Zelenin, et al. (1997). "Adenylate cyclase-coupled vasopressin receptor activates AQP2 promoter via a dual effect on CRE and AP1 elements." *Am J Physiol* **272**(4 Pt 2): F443-450.
- Yip, K. P., B. J. Cha, et al. (2015). "Functional Expression of Aquaporin-2 Tagged with Photoconvertible Fluorescent Protein in mpkCCD Cells." *Cell Physiol Biochem* **36**(2): 670-682.
- Yu, M. J., R. L. Miller, et al. (2009). "Systems-level analysis of cell-specific AQP2 gene expression in renal collecting duct." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(7): 2441-2446.
- Yu, X. H., Z. B. Tang, et al. (2014). "Apelin and its receptor APJ in cardiovascular diseases." *Clin Chim Acta* **428**: 1-8.
- Zenteno-Savin, T., I. Sada-Ovalle, et al. (2000). "Effects of arginine vasopressin in the heart are mediated by specific intravascular endothelial receptors." *Eur J Pharmacol* **410**(1): 15-23.